

Aus dem Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. Dr. med. h. c. O. Westphal)

vorgelegt über den
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. E. Dahme)

Die Arbeit wurde angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. D. K. Hammer

**Experimentelle Anti-Basalmembran-Nephritis:
Bedeutung enzymatischer Spaltprodukte der glomerulären
Basalmembran für die Autosensibilisierung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München



von

Birgit Bätjer
aus
Kassel

München 1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität
München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. D. K. Hammer/Freiburg
Korreferent: Prof. Dr. E. Dahme

Tag der Promotion: 25. Februar 1977



Herrn Prof. D. K. Hammer möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für die unermüdliche, hilfreiche Förderung der vorliegenden Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. E. Dahme danke ich für die Übernahme des Themas.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Mossmann für zahlreiche wertvolle Ratschläge und Diskussionen und seine ständige Hilfsbereitschaft.

Weiterhin danke ich Frl. U. Strohmaier und Frl. B. Hoyer für ihre gute technische Assistenz im Rahmen der Histologie.

Für die phototechnischen Arbeiten bin ich Frl. I. Strohm sehr dankbar.

Mein Dank gilt ferner der Max-Planck-Gesellschaft für die Gewährung eines Stipendiums und die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Material und Methoden</u>	5
2.1. Puffer	5
2.2. Proteine, Biochemica, Filtrations- und Ionenaustauscher- gele	5
2.3. Isolierung glomerulärer Basalmembranen von Kaninchen	8
2.4. Proteinolytischer Abbau glomerulärer Basalmembranen	9
2.4.1. Trypsinabbau	9
2.4.2. Collagenaseabbau	10
2.5. Antisera	12
2.6. Herstellung von Antisera gegen glomeruläre Basalmem- branen von Kaninchen	12
2.6.1. Immunisierungsverfahren	12
2.6.2. Absorption	13
2.6.3. Herstellung der IgG-Fraktion	15
2.7. Induktion experimenteller Glomerulonephritiden in Kaninchen	15
2.7.1. Histopathologie; 2.7.2. Immunfluoreszenz	16
2.8. Anreicherung und Reinigung von Basalmembranfragmenten aus dem Urin nephritischer Kaninchen	17
2.8.1. Gewinnung und Konzentrierung von Urin	17
2.8.2. Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose	17
2.8.3. Gelfiltration an Sephadex G-100	18
2.8.4. Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose	18
2.8.5. Affinitätschromatographie an Anti-Kaninchen IgG-	

	Seite
2.8.6. Hydrophobe Chromatographie	19
2.9. Chemische Analysen	20
2.10. Elektrophoretische Methoden	21
2.10.1. Immunelektrophorese	21
2.10.2. Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgel	21
2.11. Doppeldiffusion im Agargel	21
2.12. Zellvermittelte Reaktionen im Verlauf der experimentellen Glomerulonephritis	22
2.12.1. Isolierung von Lymphozyten über Dichtegradienten	22
2.12.2. Stimulierung von Lymphozyten (Blasttransformation) in vitro	23
3. <u>Ergebnisse</u>	24
3.1. Isolierung der GBM	24
3.2. Herstellung von enzymatischen Abbauprodukten der GBM	25
3.3. Herstellung des Anti-GBM Antiserums	28
3.4. Absorption des Anti-GBM Antiserums von der Ziege	29
3.5. Experimentelle (Anti-GBM) Glomerulonephritis beim Kaninchen	30
3.6. Anreicherung und Reinigung von GBM-Fragmenten aus dem Urin nephritischer Kaninchen	36
3.6.1. Ionenaustauscherchromatographie	36
3.6.2. Gelfiltration an Sephadex G-100	38
3.6.3. Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose	39
3.6.4. Affinitätschromatographie an Anti-Kaninchen IgG- Sepharose	42
3.6.5. Hydrophobe Chromatographie	43
3.7. Stimulierung zirkulierender Lymphozyten nephritischer Kaninchen in vitro (Blasttransformation)	44

4. Diskussion

46

5. Zusammenfassung

53

Summary

55

6. Literaturverzeichnis

57

Abkürzungen

NKS:	Normales Kaninchenserum
NZS:	Normales Ziegenserum
GBM:	Glomeruläre Basalmembranen von Kaninchen
GN:	Glomerulonephritis
IgG:	Immunglobulin G
ANTI-GBM IgG:	IgG Fraktion aus Ziegenantiserum gegen GBM
ANTI-GBM SERUM:	Ziegenantiserum gegen GBM
CGBM:	Collagenase-abgebaute GBM
TGBM:	Trypsin-abgebaute GBM
TCA:	Trichloressigsäure
FCA:	Komplettes Freundsches Adjuvans
DNS:	Desoxyribonukleinsäure
PHA:	Phythaemagglutinin

1. Einleitung

Die Kombination histologischer, elektronenmikroskopischer und immunchemischer Untersuchungen hat es ermöglicht, die pathogenetischen Zusammenhänge bei der menschlichen Glomerulonephritis eingehender zu analysieren. Es ist deshalb heute unumstritten, daß die verschiedenen Formen der Glomerulonephritis (GN) ganz überwiegend als Folge immunologischer Reaktionen entstehen (73). Durch Untersuchungen am Modell der experimentellen Glomerulonephritis wurde gezeigt, daß es vornehmlich zwei pathogenetische Mechanismen sind, die eine glomeruläre Schädigung einleiten:

1) Lokalisation zirkulierender Antigen-Antikörperkomplexe auf der epithelialen Seite der glomerulären Basalmembran (GBM). (Komplextyp) (73).

Diese Form der GN wird bei über 80% der Patienten mit glomerulären Schädigungen beobachtet.

2) Antikörper, die mit Oberflächenstrukturen der GBM selbst spezifisch reagieren (Anti-GBM-Typ) (73) und auf der endothelialen Seite lokalisiert sind.

Die GN vom Anti-GBM Typ treten bei etwa 10% der Patienten auf und werden vornehmlich beim Goodpasture Syndrome und bei progressiv verlaufenden Fällen der GN gesehen. Inwieweit neben humoralen auch zellulären Mechanismen für Pathogenese und Progression der GN Bedeutung zukommt, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt.

Insbesondere der Anti-GBM Typ der GN, der durch das klassische Modell der Masugi-Nephritis (45) repräsentiert wird, ist schon seit langem Gegenstand intensiver Untersuchungen gewesen. So führt die Immunisierung mit GBM zur Bildung spezifischer Antikörper, die nach Rückinjektion an die Spezies, die als Nierenspender diente, eine GN induzieren. Die auf diese Weise mit xenogenen

Anti-GBM Antikörpern experimentell induzierte GN läuft in zwei Phasen ab:

1. dem unmittelbaren glomerulären Insult, der durch die Reaktion von xenogenen Anti-GBM Antikörpern mit Oberflächenstrukturen der GBM eingeleitet wird, und
2. der autologen Phase, die durch die Antikörperbildung des Rezipienten gegen membrangebundene xenogene Anti-GBM Antikörper charakterisiert ist (17).

Relativ wenig ist bekannt über die immunpathogenetischen Mechanismen, die mit der Progression der Nierenschädigung assoziiert und möglicherweise gegen Gewebestrukturen der Niere selbst gerichtet sind.

Von Bedeutung sind hier:

- a) xenogene Antigene, die mit Strukturen der GBM kreuzreagieren, wie sie beispielsweise in der Membran nephritogener Streptokokken zu finden sind (67), und
- b) endogene, makromolekulare Strukturen, d.h. Basalmembranfragmente, die unter bisher nicht bekannten Bedingungen immunogen werden. Diese Annahme wird experimentell gestützt durch die Beobachtung, daß die Immunisierung mit GBM in einer autologen, allogenen oder xenogenen Spender/Empfänger Kombination eine GN induzieren kann (64,69).

Andererseits ist bewiesen, daß sowohl in der Zirkulation als auch im Urin gesunder Personen und Versuchstiere lösliche GBM-Fragmente auftreten, die unter den Bedingungen einer GN akkumulieren und mit enzymatischen Spaltprodukten der partikulären GBM kreuzreagieren (38,6). Darüberhinaus gelang es, durch Applikation GBM-haltiger Rohfraktionen aus dem Urin nephritischer Kaninchen im autologen System teilweise eine signifikante GN zu erzeugen (33).

Diese Befunde sprechen dafür, daß es im Prinzip möglich ist, die Toleranz gegen GBM durch Modifikation oder Entfaltung der nativen Membranstrukturen zu brechen, d.h. die Synthese von Anti-GBM Antikörpern in Gang zu bringen.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der chemischen Struktur der GBM, um deren Aufklärung sich verschiedene Arbeitsgruppen intensiv bemüht haben. Die Untersuchungen haben ergeben, daß die Bauelemente der GBM sich wie folgt zusammensetzen:

1. Kollagene Matrix, d.h. kollagenähnliche Peptide, an die Disaccharid-Einheiten (Galaktose-Glukose) glykosidisch gebunden sind (61).
2. Nicht-kollagenes Glykoprotein mit Heteropolysaccharideinheiten, das reich an polaren Aminosäuren ist und neben Hexosaminen Fucose, Mannose, Galaktose Sialinsäure enthält (63,26).

Einige Befunde (40,66,58) scheinen dafür zu sprechen, daß die nephritogenen Eigenschaften des GBM-Antigens mit dem nicht-kollagenen Heteropolysaccharid assoziiert sind.

Wenn auch die Bedeutung von Anti-GBM Antikörpern für den initialen Nierenschaden unumstritten ist, so kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht entschieden werden, ob sie auch für Schädigungen der Niere, wie sie für das chronische Stadium charakteristisch sind, das allein verantwortliche Pathogen darstellen.

Sicher ist jedoch, daß durch immunologische Reaktionen an der GBM das Komplement-Kinin- und Gerinnungssystem aktiviert werden (10) und somit wesentlich zur glomerulären Schädigung beitragen. Es liegen Befunde darüber vor, daß Komplement auch unabhängig von Antikörpern in der Basalmembran Depots bilden kann (70) und somit als zusätzliches Pathogen für Glomerulaschäden in Betracht kommt.

Keineswegs geklärt ist hingegen die Frage, ob zellvermittelte, zytotoxische Reaktionen allein oder assoziiert mit humoralen Antikörpern im Hinblick auf das chronische Stadium operativ sind.

Einige wenige Beiträge zur Klärung dieser Frage sprechen dafür, daß zellvermittelte Mechanismen an der Entwicklung chronischer GN beteiligt

sind (50,37,8,55).

Aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen über die Pathogenese der experimentellen GN vom Anti-GBM Typ war die vorliegende Arbeit auf zwei Schwerpunkte ausgerichtet:

1. Entwicklung von Verfahren zur Anreicherung von löslichen GBM-Fragmenten aus dem Urin nephritischer Kaninchen, und
2. vergleichende Untersuchungen über die in vitro-Stimulierbarkeit zirkulierender Lymphozyten nephritischer Kaninchen mit a) GBM-Fragmenten aus dem Urin und b) enzymatischen Spaltprodukten der partikulären GBM in Form einer Verlaufsstudie.

Hierdurch sollte geklärt werden, zu welchem Zeitpunkt im Verlauf einer progressiven GN spezifisch sensibilisierte Lymphozyten auftreten und ob diese bevorzugt durch kollagene oder nicht kollagene Strukturen der GBM in vitro stimuliert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Puffer

Tris-Glycin:

0,2 M Tris

0,5 M Glycin

0,02% Natrium-Azid

0,002% Äthylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA)
eingestellt mit HCl auf pH 7,6

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

0,14 NaCl

0,01 M NaH_2PO_4

eingestellt mit NaOH auf pH 7,0

Borat-gepufferte Kochsalzlösung (BBS):

0,15 M NaCl

eingestellt mit 0,1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ auf pH 8,2

2.2. Proteine, Biochemica, Filtrations- und Ionenaustauschergele

Für die experimentelle Arbeit wurden nachstehende Proteine,
Biochemica und Gele eingesetzt:

Kaninchen-IgG: isoliert nach dem Verfahren von
Joustra und Lundgren (2)

Ziegen-IgG: gewonnen nach der von Sober und Levy (10)
beschriebenen Methode

Collagenase: Worthington Biochemical Corporation
(aus Cl.histolyticum) CLSPA, 55H, 359x,
425 U/mg (lyoph.)
chromatographisch gereinigt.

Collagenasesubstrat: Fluka AG, Buchs, Schweiz
146948-102
4-Phenylazo-benzyloxy-carbonyl-
L-leucyl-glycyl-L-prolyl-D-arginin
Dihydrat puriss. CHR

Trypsin: Serva, Heidelberg
(3.4.4.4)2 x kristall.
37260, 180 EU/mg, Control A

Trypsininhibitor: Serva Heidelberg
37329,
chromatographisch einheitlich,
aus Sojabohne

Desoxyribonuclease Serva Heidelberg,
(3.1.4.5)
Lyophil., rein, aus Rinderpankreas,
ca. 30000 Dornase E/mg

Aluminiumhydroxyd: Alu Gel 8,
Serva, Heidelberg,
2% Al(OH)₃, Trockensubstanz in Wasser,
pyrogenfrei, gealtert.

Isopaque:	Sodium Metrizoate Solution 75% w/v Nyegaard & Co, A/S, Oslo, Norway
Ficoll:	Ficoll 400 Lot. No. 0638 Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
Sephadex G-100:	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden Lot. No. 5011
Sephadex G-200:	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden Lot. No. 1560
DEAE-Cellulose:	DE 32 Whatman Microgranular, Lot. No. 6899 Maidstone, England
QAE-Sephadex A-50:	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden Lot. No. 0695
Aktivierte CH-Sepharose 4B:	Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Schweden, Batch. No. 1240

2.3. Isolierung glomerulärer Basalmembranen von Kaninchen

Nieren von entbluteten Kaninchen wurden mit kalter 0,15 M NaCl durch die Nierenarterie blutfrei gespült, entkapselt und bei -70°C aufbewahrt.

Die Isolierung glomerulärer Basalmembranen erfolgte im Prinzip nach dem von Krakower und Greenspon(29) beschriebenen und von Spiro (60) modifizierten Verfahren unter Berücksichtigung nachfolgender Änderungen:

Von tiefgefrorenen Nieren wurde die Nierenrinde (500 g Nassgewicht) entfernt und mit Hilfe eines Fleischwolfes homogenisiert. Das Homogenisat wurde mit schwachem Druck mit Hilfe eines Erlenmeyerkolbens durch ein Kupfersieb (Siebtechnik GmbH, Mülheim/Ruhr) mit einem Durchmesser von 20 cm und einer Maschenweite von 0,125 mm passiert und mit insgesamt 3 l kalter NaCl gewaschen. Dabei wurde für die Aufarbeitung von 50 g Nierenrinde jeweils ein neues Sieb benutzt. Die gesiebte Gewebesuspension wurde in 1 Liter-Portionen sukzessive durch eine Kombination von Sieben mit 0,18 mm bzw. 0,053 mm Maschenweite passiert. Das auf dem feineren Sieb verbleibende Material wurde dann mit kalter 0,15 M NaCl so lange gewaschen (ca. 20 l), bis das glomeruläre Retentat praktisch frei von Tubulismaterial war. Die Siebe wurden von der Innen- und Rückseite mit kalter NaCl sorgfältig gespült und die Suspension in 250 ml Zentrifugeneinsätze aus Polyäthylen überführt. Anschließend wurde für 15 Minuten bei 1000 g (4°C) zentrifugiert, die Sedimente vereinigt und in 20 ml 1 M NaCl resuspendiert. Zur Gewinnung der Basalmembranen wurde die glomeruläre Suspension im Eisbad 5x je eine Minute mit Hilfe eines Ultraschall-

gerätes (Branson Sonic Company, Sonifier^R B-12, Branson, Connecticut) beschallt.

Zwischen den einzelnen Beschallungen wurde ein beschallungsfreies Intervall von jeweils 1 Minute zur Kühlung der Suspension eingehalten. Die Desintegration der Glomerula wurde mikroskopisch geprüft, die Suspension bei 2000 g für 10 Minuten (4°C) zentrifugiert und anschließend unter den gleichen Bedingungen in 0,15 M NaCl gewaschen. Das letzte Sediment wurde in 0,15 M NaCl resuspendiert und nach Zugabe von 2 mg Desoxyribonuklease bei 37°C im Wasserbad kontinuierlich gerührt.

Zur Entfernung des Salzes wurde die Suspension zentrifugiert, 5x in kaltem destilliertem Wasser gewaschen, lyophilisiert und das Gewicht des lyophilisierten Präparates bestimmt. Zusätzlich wurde der Stickstoffgehalt nach dem Mikro-Kjeldahlverfahren^a (3) und der Phosphorgehalt nach der Lowry-Methode^b (35) analysiert.

^{a, b} Beide Bestimmungen wurden freundlicherweise von FrI. Dr. Fromme durchgeführt.

2.4. Proteinolytischer Abbau der GBM

2.4.1. Trypsinabbau

Der proteinolytische Abbau der GBM mit Hilfe von Trypsin erfolgte in Anlehnung an die von Shibata (56) beschriebene Methode. GBM wurde in Borat-gepufferter NaCl pH 8,2 suspendiert, Trypsin in einem Substrat/Enzymverhältnis von 100:1 (w/w) zugesetzt und jeweils auf die Dauer von 5 bzw. 12 Stunden bei 37°C im Wasserbad unter ständigem Rühren inkubiert. Der pH-Wert wurde während der Inkubationszeit durch Zugabe von 0,1 M Na₂B₄O₇ konstant bei 8,2 gehalten. Zur Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz auf 4°C gebracht und Trypsininhibitor in einem Enzym/

Inhibitorverhältnis von 1:1 zugesetzt. Danach wurden die Spaltansätze bei 27000 Rpm in der Ultrazentrifuge (Spinco, Modell L/L₂, Beckmann Instruments, Detroit) zentrifugiert, das Sediment verworfen und der Proteingehalt im Überstand durch Aminosäureanalyse (2.9.1) bestimmt. Danach wurde das Trypsinabbauprodukt (TGBM) gegen PBS dialysiert und auf spezifische Reaktionsfähigkeit mit Anti-GBM IgG in der Doppeldiffusion im Agargel geprüft und anschließend bei -20°C konserviert.

2.4.2. Collagenaseabbau

Reinigung der Collagenase

Das von der Firma Worthington erhältliche, als chromatographisch rein bezeichnete Collagenase-Präparat wurde nochmals an Sephadex G-200 nach der von Peterkovsky und Diegelmann (48) beschriebenen Methode chromatographiert. Zu diesem Zweck wurden 30 mg Collagenase in 0,05 M Tris-HCl (enthaltend 0,005 M CaCl₂) pH 7,6 gelöst und auf eine gegen denselben Puffer äquilibrierte Sephadex G-200 (1,5 x 120 cm) Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte bei Zimmertemperatur mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 20 ml pro Stunde.

Alle chromatographischen Analysen im Rahmen nachfolgender Experimente wurden bei 4°C durchgeführt. Das Sammeln eluierter Fraktionen erfolgte mit Hilfe eines Fraktionssammlers (Ultrorac, LKB Producter, Stockholm) innerhalb einer Kühlbox (27). Die Absorption wurde kontinuierlich durch ein Uvicordsystem (LKB Producter, Stockholm) bei 280 nm gemessen.

Fraktionen, die gereinigte Collagenase enthielten, wurden vereinigt, lyophilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

Fibrinolysetest

Als Maß für die proteolytische Aktivität wurde die handelsübliche Collagenase sowie das an Sephadex G-200 rechromatographierte Präparat auf fibrinolytische Eigenschaften analysiert.

Als Testbasis dienten Fibrinplatten (1), auf die jeweils ein Tropfen einer 1%igen Testlösung und als Kontrolle ein Tropfen Tris-HCl Puffer aufgetragen wurde.

Nach 1-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Platte auf das Vorhandensein von Fibrinolysezonen untersucht.

Quantitative Bestimmung der Collagenase-Aktivität gereinigter Collagenase

Die enzymatische Aktivität der handelsüblichen Collagenase wurde im Vergleich mit dem an Sephadex G-200 rechromatographierten Präparat nach dem von Wünsch und Heydrich (75) beschriebenen Verfahren gemessen.

Als Substrat diente das unter 2.2. angegebene Präparat.

Enzymatischer Abbau der GBM mit Collagenase

Der enzymatische Abbau der GBM mit gereinigter Collagenase erfolgte im Prinzip nach dem von Spiro (60) beschriebenen Verfahren.

GBM wurde in 0,1 M Tris-Acetat Puffer (enthaltend 0,005 M Calciumacetat, eingestellt mit Eisessig auf pH 7,0) suspendiert, Collagenase zugesetzt und der Ansatz unter Rühren bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Weitere Zugaben von Collagenase erfolgten nach 24 und 48 Stunden, so daß die zugesetzte Collagenasemenge insgesamt 1% des Substratgewichtes betrug.

Nach Abschluß der Inkubation (72 Stunden) wurde das nicht abgebaute Material durch Zentrifugation (20 Minuten bei 2000 g) sedimentiert und die Proteinkonzentration im Überstand durch Aminosäureanalyse (2.9.) bestimmt.

2.5. Antisera

Die verwendeten Antisera wurden nach einem von Hammer und Mitarbeitern (18) verwendeten Immunisierungsschema gewonnen: Anti-Kaninchensera vom Schaf, Anti-Ziegensera vom Kaninchen.

2.6. Herstellung von Antisera gegen GBM von Kaninchen

2.6.1. Immunisierungsverfahren

GBM (25 mg) wurden analog dem von Franěk (16) beschriebenen Verfahren in 2,0 ml NaHCO_3 (0,25%) suspendiert, 2,0 ml Alu Gel s zugesetzt und 1 Stunde bei 4°C gehalten. Anschließend wurde die Suspension in 4,0 ml FCA (Difco, Detroit) inkorporiert und einer 1 Jahr alten Ziege (weiße Hausziege) wie folgt appliziert: jeweils 0,5 ml intramuskulär im Bereich des rechten und linken Musculus semitendineus und triceps brachii, je 0,5 ml subkutan rechts und links im Bereich der Axillar- und Inguinal-lymphknoten und zusätzlich 4 ml intrakutan an 20 verschiedenen Stellen auf der Rückenhaut.

Restimulierungen erfolgten 2 und 5 Monate nach primärer Immunisierung mit jeweils 15 mg GBM nach dem gleichen Immunisierungsschema mit Ausnahme der intrakutanen Injektionen.

Beginnend mit dem 7. Tag nach erster und zweiter Restimulierung wurden der Ziege im Abstand von 3 Tagen über einen Zeitraum von insgesamt 2

Wochen jeweils 120 ml Blut aus der Vena jugularis entnommen und anschließend ein korrespondierendes Volumen Plasmaexpander (Neo-Plasmagel, Braun, Melsungen) injiziert. Die Blutproben wurden für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert, 1 Tag bei 4°C gehalten und anschließend das Serum durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 1700 g (4°C) gewonnen. Die einzelnen Serumproben wurden in der Doppeldiffusion im Agargel (2.11.) auf spezifische Reaktionsfähigkeit mit GBM geprüft, Serumchargen mit signifikanter Antikörperkonzentration vereinigt und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Die Ziege wurde 3 Monate nach der letzten Immunisierung getötet und die Nieren histologisch untersucht.

2.6.2. Absorption

Zur Absorption von Anti-GBM Serum wurden Membranen von Kaninchenerythrozyten nach dem von Dodge (14) beschriebenen Verfahren unter Verwendung von 0,005 M NaH_2PO_4 , pH 8,0 gewonnen. Gepackte Membranen wurden in Anti-GBM Serum suspendiert, für 2 Stunden bei 20°C unter Rühren inkubiert und anschließend bei 14000 g zentrifugiert.

Darüberhinaus wurde das Anti-GBM Serum mit Kaninchenserum absorbiert. Zu diesem Zweck wurde Kaninchenserum nach der von Avrameas und Ternynk (2) beschriebenen Methode mit 2,5%igem Glutaraldehyd vernetzt, das unlösliche Derivat in Anti-GBM Serum resuspendiert, der Ansatz für 2 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt und anschließend bei 1000 g für 10 Minuten (4°C) zentrifugiert.

Da es nicht in allen Fällen gelang, mit Hilfe dieses Absorptionsverfahrens Antikörperquoten gegen Serumproteine quantitativ zu eliminieren,

wurde zusätzlich ein zweites Absorptionsverfahren eingesetzt. Zu diesem Zweck wurde normales Kaninchenserum gegen Äthylendiaminacetat^a pH 7,0 dialysiert, für 1 Stunde bei 23000 g zentrifugiert, mit dem korrespondierenden Puffer im Verhältnis 1:1 verdünnt und an einer gegen diesen Puffer äquilibrierten QAE-Sephadex-Säule (4 x 65 cm) nach der von Joustra und Lundgren (25) beschriebenen Methode chromatographiert. Nach der mit Startpuffer gewonnenen ersten Fraktion (Fraktion I) wurde eine zweite Fraktion (Fraktion II) mit Acetatpuffer^b pH 4,0 eluiert. Die Fraktionen wurden durch Ultrafiltration (5) eingeengt, immunelektrophoretisch analysiert (2.10.1.) und anschließend lyophilisiert.

Zur Absorption wurde in 150 ml Anti-GBM Serum 1 g Fraktion II gelöst, 1 Stunde bei Zimmertemperatur, danach für weitere 12 Stunden bei 4°C gerührt und nach Abschluß der Inkubation für 20 Minuten (4°C) bei 1500 g zentrifugiert.

Nach erfolgter Absorption wurde das Anti-GBM Serum auf das Freisein von
a) haemagglutinierenden Antikörpern gegen Kaninchenerythrozyten und
b) präzipitierenden Antikörpern gegen Kaninchenserumproteine geprüft.

^a 0,048 M Äthylendiamin (frisch destilliert)
0,073 M Essigsäure
pH 7,0

^b 0,26 M Essigsäure
0,078 M Natriumacetat
pH 4,0

2.6.3. Herstellung der IgG Fraktion

Anti-GBM Serum wurde im Verhältnis 1:1 mit 0,15 M NaCl verdünnt und auf 4°C gebracht. Anschließend wurde ein aliquotes Volumen 3,6 M Ammoniumsulfatlösung pH 7,0 tropfenweise unter ständigem Rühren zugefügt, der Ansatz für weitere 30 Minuten gerührt und anschließend bei 1500 g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Sediment in PBS gelöst und durch Zusatz eines aliquoten Volumens 3,6 M Ammoniumsulfatlösung repräzipitiert. Danach wurde das Sediment zweimal mit 1,8 M Ammoniumsulfat gewaschen, in PBS gelöst und ausgiebig gegen den gleichen Puffer dialysiert (4°C). Das Retentat wurde durch Ultrafiltration auf einen Proteingehalt von 3% ankonzentriert und danach gegen 0,0175 M Phosphatpuffer pH 8,0 äquilibriert. Anschließend wurde die durch Salzfällung erhaltene Ig-Rohfraktion an DEAE-Cellulose chromatographiert und stufenweise mit Phosphatpuffer steigender Molarität eluiert. Die Fraktionen wurden vereinigt, durch Ultrafiltration eingengt, der Proteingehalt mit einer modifizierten Biuretmethode nach Weichselbaum (2.9.) bestimmt und in der Doppeldiffusion im Agargel auf das Vorhandensein von Anti-GBM Antikörpern analysiert.

2.7. Induktion experimenteller Glomerulonephritiden in Kaninchen

10 Wochen alte Kaninchen (Kreuzung aus Alaska und Wiener Nachkommen) im Gewicht von ca. 2 kg erhielten eine intravenöse Injektion von 20 mg/ml Anti-GBM IgG. Anschließend wurden die Tiere täglich für 14 Stunden in Stoffwechselkäfigen gehalten. Das Sammeln von Urin erfolgte in Bechergläsern, die zur Verhinderung bakterieller Kontamination zuvor mit 10 ml 0,4% Natriumazid beschickt wurden.

Die Proteinausscheidung in den Tagesurinen wurde durch Zusatz von 20%

Trichloressigsäure über einen Zeitraum von mindestens 6 Wochen verfolgt.

2.7.1. Histopathologie

Kaninchen wurden autopsiert, Gewebestücke aus dem Bereich der Nierenrinde in Bouin fixiert und in Paraplast eingebettet. Die Schnitte wurden entweder mit Hämalaun-Eosin (9,50) oder mit Hilfe der PAS-Reaktion (9) gefärbt.

2.7.2. Immunfluoreszenz

Stücke aus der Nierenrinde wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im Kryostaten (System Dittes-Duspiva) Schnitte von 2 μ Schichtdicke hergestellt.

Für die fluoreszenzoptischen Untersuchungen wurden nachfolgende, mit Fluoreszein-Isocyanat konjugierte Antikörperpräparate, im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt, verwendet:

- a) Anti-Ziegen IgG vom Kaninchen und
- b) Anti-Kaninchen IgG von der Ziege (Miles Laboratories, England).

Die Antikörperpräparate wurden vor Gebrauch mit 50 mg lyophilisierter Kaninchenleber/ml Konjugat und mit 50mg lyophilisierter Kaninchenniere/ml Konjugat absorbiert.

Als Kontrollpräparat wurden Anti-Kaninchen IgG, absorbiert mit Kaninchen IgG, und Anti-Ziegen IgG, absorbiert mit Ziegen IgG, eingesetzt.

2.8. Anreicherung und Reinigung von GBM-Fragmenten aus dem Urin nephritischer Kaninchen

2.8.1. Konzentrierung von Urin

Urinproben nephritischer Kaninchen wurden bei 1500 g (4°C) zentrifugiert, über Kristalltheorit (Nr. 3, Seitz-Asbestwerke, Bad Kreuznach) filtriert und anschließend mit Hilfe von Amicon-Filtern (Amicon-Ultrafiltration-Cell, Modell 202, Nr. 201883, Membran-X-50, Amicon, Massachusetts) unter Verwendung eines Vorratsgefäßes (Modell RS 4, Type 316, Amicon, Mass.) auf ca. 1/40 des Originalvolumens konzentriert.

2.8.2. Ionenaustauscherchromatographie

Konzentrierter Urin wurde gegen 0,0175 M NaH_2PO_4 pH 8,0 dialysiert und der Proteingehalt bestimmt. Anschließend wurden Urinchargen in 2-3%igen Lösungen auf eine DEAE-Cellulose-Säule (4,5 x 50 cm), die gegen den gleichen Puffer äquilibriert war, aufgetragen und stufenweise mit Phosphatpuffer pH 8,0 steigender Ionenstärke eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt, durch Ultrafiltration eingengt und die Proteinkonzentration bestimmt. Die einzelnen Fraktionen wurden mit Hilfe von a) Anti-GBM IgG, b) Anti-Kaninchen Vollserum und c) Anti-Kaninchen IgG in der Doppeldiffusion im Agargel analysiert.

Zur weiteren Anreicherung von GBM-Fragmenten diente die mit dem Startpuffer vom Ionenaustauscher eluierte Fraktion I (DEAE-I) als Ausgangsmaterial.

2.8.3. Gelfiltration an Sephadex G-100

Urin-GBM-haltige Testlösungen wurden gegen Tris-Glycinpuffer dialysiert und an einer Sephadex G-100-Säule (5 x 100 cm), äquilibriert mit dem korrespondierenden Puffer, aufsteigend mit Hilfe einer Perplex-Pumpe (Perplex Peristaltic Pump, 10200, LKB, Stockholm) chromatographiert.

Die erhaltenen Fraktionen wurden durch Ultrafiltration eingeengt und in der Doppeldiffusion im Agargel auf das Vorhandensein von GBM-Fragmenten analysiert.

2.8.4. Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose

Protein A wurde aus *Staphylococcus aureus*-Kulturen nach dem von Sjöquist und Hjelm (56) beschriebenen Verfahren isoliert und anschließend an Sepharose 6 B mit Hilfe von Bromcyan gekuppelt (22).

In einem repräsentativen Experiment wurden 4 mg Protein/ml gepacktes Sepharosegel gekuppelt. Die Absorptionskapazität von Protein A-Sepharose wurde wie folgt bestimmt:

152 mg Kaninchen IgG wurden an 150 ml gepackter Gelmatrix mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 15 ml/Std. chromatographiert. Das Gel wurde anschließend mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2 gewaschen, das an Protein A-Sepharose gebundene IgG mit 0,1 M Glycin-HCl, pH 3,0 dissoziiert und anschließend der Proteingehalt des Eluates mit 28 mg ermittelt. 0,2 mg Kaninchen IgG wurden also pro ml gepackte Gelmatrix gebunden. Die eigentliche Chromatographie erfolgte mit den gleichen Puffern an einer Säule von der Größe 2,0 x 12 cm.

Die Fraktionen wurden in der Doppeldiffusion im Agargel, in der Immunelektrophorese und in der Disk-Elektrophorese analysiert.

2.8.5. Affinitätschromatographie an Anti-Kaninchen IgG-Sepharose

Die Kupplung von IgG an aktivierte CH-Sepharose 4 B erfolgte nach dem vom Hersteller angegebenen Verfahren. Dabei wurden 450 mg von 600 mg Anti-Kaninchen IgG an 4 g Sepharose gebunden, das entsprach einer Kupplungskapazität von 63%. Die Kapazitätsbestimmung wurde wie unter 2.8.4. beschrieben durchgeführt und dabei wurden 0,6 mg Kaninchen-IgG pro ml gepackte Anti-IgG-Sepharose gebunden.

Urin-Fractionen unterschiedlicher Vorreinigung wurden unter denselben Bedingungen wie bereits für Protein A-Sepharose beschrieben, an Anti-IgG-Sepharose (1,0 x 4 cm) chromatographiert, die erhaltenen Fraktionen durch Ultrafiltration eingengt und mittels Immunelektrophorese und Doppeldiffusion im Agargel charakterisiert.

2.8.6. Hydrophobe Chromatographie

Eine weitere Anreicherung von GBM-Fragmenten wurde nach dem Prinzip der salz-vermittelten hydrophoben Chromatographie versucht. Zu diesem Zweck wurde nach dem von Cuatrecasas (11) beschriebenen Verfahren L-Phenylalanin an Bromcyan-aktivierte Sepharose 4 B bei pH 9,8 kovalent gekuppelt^a, wobei der Anteil von L-Phenylalanin 0,54% betrug.

^a durchgeführt vom Labor Dr. Kickhöfen

Die Chromatographie wurde nach der von Doellgast und Plaut (15) angegebenen Methode durchgeführt und die eluierten Fraktionen auf das Vorhandensein von GBM-Fragmenten in der Doppeldiffusion im Agargel analysiert.

2.9. Chemische Analysen

Der Proteingehalt in Testlösungen wurde mit Hilfe der Biuretmethode nach Weichselbaum (70) oder nach einem methodisch modifizierten Verfahren (28) bestimmt.

Stickstoffanalysen^a erfolgten nach dem Mikro-Kjedahlverfahren (3) und der Gesamtphosphorgehalt^b wurde nach der von Lowry (35) beschriebenen Methode analysiert.

Aminosäureanalysen^c wurden nach Säurehydrolyse der Testlösungen (24 Stunden, 6N HCl, 110°C) im Aminosäureanalyator Durum 500 durchgeführt unter Verwendung von Norleucin als internen Standard.

^{a, b} Die Stickstoff- und Phosphoranalysen wurden freundlicherweise von Frl. Dr. Fromme durchgeführt.

^c Die Aminosäureanalysen wurden dankenswerterweise von Herrn Warth durchgeführt.

2.10. Elektrophoretische Methoden

2.10.1. Immunelektrophorese

Immunelektrophoresen erfolgten nach einer von Hirschfeld (21) beschriebenen Mikromethode unter Verwendung einer Elektrophorese-Standard-Apparatur (Gelman Instrument Company, Michigan, USA) bei einer Spannung von 280 V und 7 mA über einen Zeitraum von 75 Minuten. Als Trägermedium diente 1,5%ige Agarose (Agarose für Gelelektrophorese, Typ HSA, Batch No. 0264, Litex, Denmark) und die Färbung getrockneter Gele erfolgte mit Amidoschwarz.

2.10.2. Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgel

Die Disk-Elektrophorese wurde in 7,5%igem Gel bei pH 7,2 nach der von Davis (12) beschriebenen Methode durchgeführt.

Die elektrophoretische Trennung der Komponenten erfolgte in Gegenwart von 0,1% Natriumdodecylsulfat (71) und 0,5 M Harnstoff.

Für die Standardisierung wurden Proteine mit bekanntem Molekulargewicht als Referenz eingesetzt. Auf das Gel wurden jeweils 20-180 µg Protein/10 µl aufgetragen. Die Gele wurden nach der Elektrophorese in Coomassie Blue (44) gefärbt.

2.11. Doppeldiffusion im Agargel

Die Doppeldiffusion im Agargel wurde analog der von Hirschfeld (14) angegebenen Methode in 1,5% Agarose, gelöst in Barbituratpuffer pH 8,6, durchgeführt.

2.12. Gewinnung und in vitro Stimulierung zirkulierender Lymphozyten

2.12.1. Isolierung von Lymphozyten im Dichtegradienten

Die Isolierung von Lymphozyten aus dem peripheren Blut nephritischer Kaninchen und von Kontrolltieren erfolgte nach einer Modifikation des von Böyum (7) beschriebenen Verfahrens. Ein Teil einer 10% EDTA-Lösung wurde mit 9 Teilen Kaninchenblut gemischt und anschließend je 6 ml dieses EDTA-Blutes mit 18 ml 0,15 M NaCl verdünnt. Mit dieser Zellauspension wurden 9 ml Isopaque-Ficoll-Gemisch (10 Teile Isopaque, 32,8%, 24 Teile Ficoll, 8%) mit einer Dichte von $1,077 \pm 0,01$ g/ml bei 20°C überschichtet. Unmittelbar danach wurde der Ansatz bei 500 g (20°C) für 40 Minuten zentrifugiert, die Zellsuspension im Bereich der Interphase abgesaugt, mit Eagle-Medium^a auf das Doppelte des Volumens verdünnt, bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert und zweimal in 10-fachem Volumen gewaschen. Das Zellsediment wurde in 1,0 ml Eagle-Medium mit Zusatz von 20% NKS resuspendiert, mit 0,2% Trypanblau gemischt und die Zahl der lebenden Zellen (Ausschluß von Trypanblau) in der Neubaur Zählkammer bestimmt.

Für die Stimulierung von Lymphozyten in vitro wurde die Zellkonzentration auf 25×10^5 /ml eingestellt.

^a Eagle-Medium: Dulbecco's Modified Eagle Modified

Cat. No. H-16

With: Glutamine

Without: Sodium Bicarbonate

Gibco, New York, U.S.A.

Ansatz für 1 l: 10,02 g Eagle-Pulver

100 00 IE. Penicillin

3,7 g NaHCO₃

4,76 g N-2-Hydroäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure (Hepes)

2.12.2. In vitro Stimulierung von Lymphozyten mit Antigen

Die Stimulierung von Lymphozyten erfolgte mit Hilfe von Gewebekulturplatten (Microtest II tissue culture plates, Falcon Plastics, Oxnard, Calif., Cat. No. 3040). Im einzelnen Ansatz wurden 200 μ l (5×10^5) Zellsuspension entweder mit 10 μ l a) Phythämäglutinin (PHA, 10 μ g), b) TGBM (16 μ g), c) CGBM (16 μ g) oder GBM enthaltender Urinfraktion (Urin-GBM, 70 μ g) inkubiert. Als Kontrolle dienten 200 μ l Eagle-Medium mit 20% NKS-Zusatz. Die Stimulierung der Zellsuspensionen erfolgte jeweils in 4- oder 6-fachem Ansatz. Die Platten wurden bei 37°C für 48 Std. im CO₂-Schrank inkubiert und anschließend 1 μ Ci³H-Thymidin (The Radiochemical Centre, Amersham UK., Code TRK 120) in 50 μ l-Portionen zugesetzt. Nach 16-stündiger Inkubation wurden die Mikrokulturen mit Hilfe einer automatischen Einrichtung (Mash II, Microbiological Associates, Bethesda, Md) geerntet, auf Glasfaserplättchen (Reeve Angle, Clifton, NJ, Grade Nor. 934 AH) übertragen und anschließend mit Aqua dest. ausgiebig gewaschen.

Die Filterplättchen wurden dann bei 56°C im Wärmeschrank getrocknet, in Szintillationsgefäße überführt und für 2 Std. in 0,6 ml Soluene-100 (Packard) bei 56°C inkubiert.

Nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit^a wurde die Radioaktivität in einem Packard (Tricarb liquid scintillation spectrometer, model 3375) gemessen.

Die Auswertung des Versuches erfolgte durch die Berechnung des Stimulierungsverhältnisses, d.h.:

$$\frac{\text{CPM Kultur mit Antigen}}{\text{CPM Kultur ohne Antigen}}$$

^a Szintillationsflüssigkeit:

1,5 g Dimethyl-1,4-bis-2(-5-phenyloxazolyl)-benzol (POPOP)

25 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) in 5 l Toluol, C.Roth, Karlsruhe, Kat.-Nr. 5314, 3689

Die durchschnittliche Standardabweichung aller gemessenen Werte lag bei 13,6%.

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung der GBM

Die Isolierung von Glomerula aus dem Rindenanteil von Kaninchennieren erfolgte im Prinzip nach dem von Spiro (60) beschriebenen Verfahren. Durch mikroskopische Kontrolle der Glomerulafraktionen zeigte sich jedoch, daß Kaninchenglomerula die von Spiro für den zweiten Reinigungsschritt verwendete Siebkombination (0,18 mm/0,10 mm) passieren. Für die Reinigung wurden deshalb Siebe mit einer Maschenweite von 0,053 mm eingesetzt und die Glomerulasuspension mit kalter NaCl ausgiebig gewaschen, bis das Präparat frei von Zellen und Gewebefragmenten war. Der glomeruläre Anteil der Suspension lag über 98%. Daneben fanden sich unter 2% tubuläre Fragmente, die in der Regel an Glomerula attachiert waren.

Die auf der Sieboberfläche verbleibende Glomerulasuspension wurde in Zentrifugengläser überführt, zentrifugiert, mehrmals gewaschen und nach Resuspendierung zur Gewinnung von Basalmembranen durch Ultraschall behandelt. Dabei wurden selbstverständlich auch anhaftende Zellen und Tubuli zerstört und deren DNS freigesetzt. Zur Entfernung der DNS wurde der Basalmembransuspension deshalb Deoxyribonuklease zugesetzt, anschließend inkubiert, zentrifugiert, konsekutiv mit NaCl und Aqua dest. gewaschen und schließlich lyophilisiert. Als Reinheitskriterium wurde zusätzlich zu den morphologischen Analysen der Phosphorgehalt der lyophilisierten Präparate bestimmt. Die Ausbeute des lyophilisierten Präparates lag im Durchschnitt bei 90 mg pro 500 g Nierenrinde (Naßgewicht) mit

einem Phosphorgehalt von 0,2 mg/100 mg.

3.2. Herstellung von enzymatischen Abbauprodukten der GBM

Zur Gewinnung löslicher GBM-Präparate wurde partikuläre GBM mit Trypsin bzw. Collagenase proteolytisch abgebaut. Nach Inkubation von 25 mg GBM mit 250 µg Trypsin wurden nach 5 Stunden 172 µM Aminogruppen/100 mg GBM und nach 12 Stunden 212 µM Aminogruppen/100 mg GBM freigesetzt, was einer Ausbeute von 25% (6,46 mg Protein) bzw. 32% (8mg Protein) entsprach.

Da handelsübliche, chromatographisch gereinigte Collagenase messbare Mengen an fibrinolytischer Aktivität enthielt, wurden die Präparate durch Rechromatographie an Sephadex G-200 weiter gereinigt (48).

Das in Abb. 1 wiedergegebene Elutionediagramm zeigt, daß im Wesentlichen zwei Fraktionen (I und II) erhalten wurden.

Fraktion I erwies sich frei von proteolytischer Aktivität, während Fraktion II die gesamte fibrinolytische Aktivität enthielt.

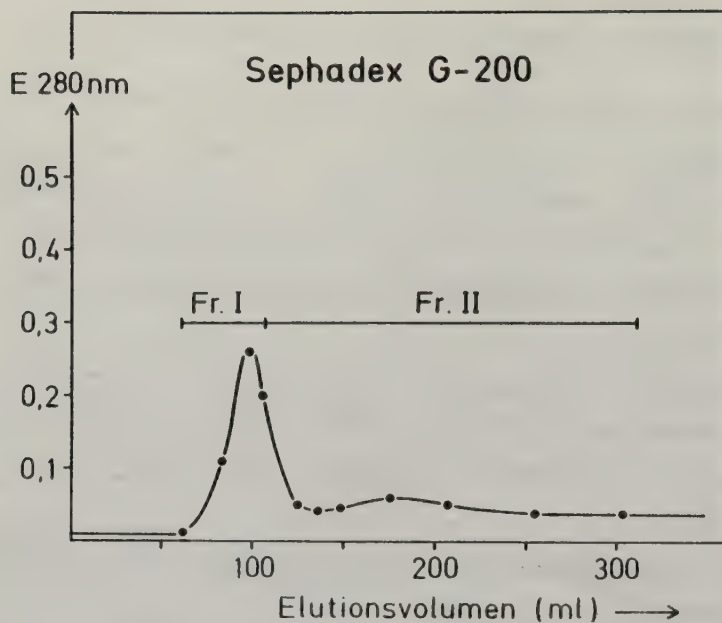


Abb. 1: Rechromatographie einer handelsüblichen chromatographisch gereinigten Collagenase an Sephadex G-200 in Tris-HCl Puffer, pH 7,6. Aufgetragen wurden 30 mg Collagenase in 3 ml Tris-HCl.
Fraktion I : gereinigte Collagenase
Fraktion II: Collagenase, kontaminiert mit fibrinolytischer Aktivität

Bei Einsatz von 30 mg handelsüblicher Collagenase lagen die Ausbeuten an gereinigter Collagenase bei 70% (21 mg).

Die Aktivität handelsüblicher und gereinigter Collagenase wurde vergleichend nach der von Wünsch und Heydrich (75) angegebenen Methode getestet. Dabei zeigte das gereinigte gegenüber dem handelsüblichen Präparat eine Aktivitätssteigerung von 614 auf 640 Einheiten.

Durch Behandlung von 50 mg GBM mit gereinigter Collagenase (500 µg) für 72 Stunden wurden 136 µM Aminogruppen/100 mg GBM freigesetzt, was einer Ausbeute von 20% (10,2 mg Protein) entsprach. Die durch Trypsin- bzw. Collagenasespaltung erhaltenen GBM-Abbauprodukte wurden in der Doppeldiffusion im Agargel analysiert (Abb. 2)

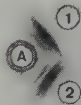


Abb. 2: Vergleichende immunologische Analyse von TGBM, 0,3% (1) und CGBM, 0,3% (2), nach Reaktion mit Anti-BM IgG(A).

Anti-GBM IgG bildete nach Reaktion mit TGBM zwei, mit CGBM hingegen drei Präzipitationslinien. Wie Abb. 2 deutlich zeigt, weisen TGBM und CGBM zwei Präzipitationslinien mit totaler Koaleszenz auf, was dafür spricht, daß die beiden Komponenten immunologisch identisch sind.

3.3. Herstellung von Anti-GBM Antiserum

Die Produktion spezifischer Antisera gegen Kaninchen-GBM erfolgte in einer Ziege durch Applikation von 25 mg GBM in komplettem Freund's Adjuvans. Das Tier wurde nach 2 und 5 Monaten mit jeweils 15 mg GBM restimuliert und erhielt somit insgesamt 55 mg GBM. In dem gewählten xenogenen Spender/Empfängersystem führte die Immunisierung mit GBM zu einer rasch verlaufenden, progressiven GN mit Proteinurie und Urämie. Da die Ziege als Antikörperspender diente, wurde auf eine histopathologische Verlaufsuntersuchung an Biopsiematerial verzichtet. Die Tötung der Ziege erfolgte 8 Monate nach dem Primärstimulus im Finalstadium mit 40 ml Narcoren intravenös.

Histologisch zeigte die Niere (Abb. 3) das Bild einer diffusen, mesangio-proliferativ-sklerotisierenden GN.

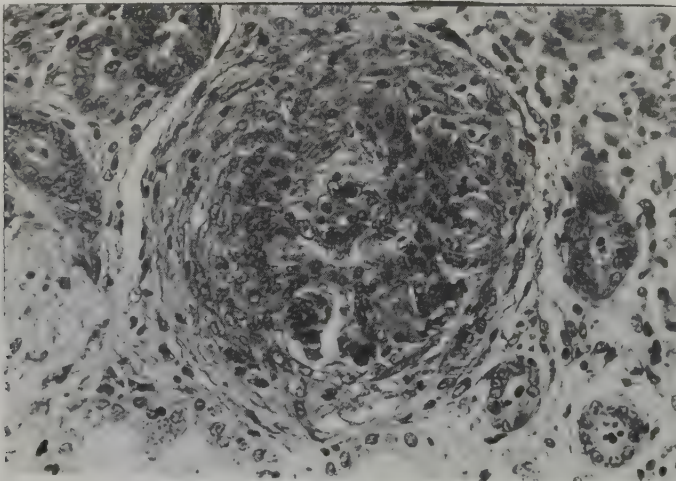


Abb. 3: Glomerulum einer Ziege, 8 Monate nach Immunisierung mit Kaninchen-GBM. Die glomerulären Veränderungen sind repräsentativ und zeigen das Bild einer mesangioproliferativ-sklerotisierenden GN. HE-Färbung. Vergrößerung 320 x.

3.4. Absorption des Anti-GBM-Antiserums von der Ziege

Der Anti-GBM Serumpool wurde so lange mit Erythrozytenmembranen absorbiert, bis hämagglutinierende Antikörper nicht mehr nachweisbar waren.

Zur Elimination von Antikörpern gegen Serumproteine wurden 240 ml Anti-GBM Antiserum mit 800 mg Kaninchenserumprotein, vernetzt mit Glutaraldehyd, absorbiert.

Durch dieses Absorptionsverfahren gelang es jedoch nicht, sämtliche Antikörperquoten gegen Kaninchenserumproteine zu entfernen.

Deshalb wurde ein zweiter Absorptionsschritt durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 250 ml NKS an QAE-Sephadex A-50 chromatographiert, die IgG-freie Fraktion II lyophilisiert und diese mit Anti-GBM Antiserum absorbiert. Das so absorbierte Anti-GBM Antiserum wurde mit 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgesalzen und die Ig-Rohfraktion an DEAE-Cellulose zur Gewinnung einer gereinigten IgG-Fraktion (Anti-GBM IgG) chromatographiert.

Mit Hilfe dieses Absorptionsverfahrens gelang es, präzipitierende Antikörperquoten gegen Kaninchenserumproteine vollständig zu entfernen.

Die Immunelektrophoretische Analyse von Anti-GBM IgG ergab eine reine IgG-Fraktion (Abb. 4).

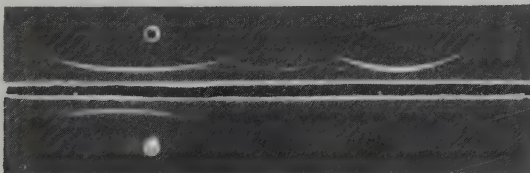


Abb. 4: Immunelektrophoretische Analyse der gereinigten Anti-GBM IgG-Fraktion, isoliert durch Chromatographie einer Anti-GBM-Ig-Rohfraktion an DEAE-Cellulose.

Oberes Loch: Originales Anti-GBM Antiserum als Referenz

Unteres Loch: Gereinigte Anti-GBM IgG-Fraktion

Rinne: Anti-Ziegenserum vom Kaninchen.

Anode rechts

3.5. Experimentelle (Anti-GBM) Glomerulonephritis bei Kaninchen

Experimentelle Glomerulonephritiden wurden bei insgesamt 49 Kaninchen durch Applikation von 20 mg Anti-GBM-IgG induziert und der Verlauf der Erkrankung über einen Zeitraum von 18 Monaten verfolgt.

Bei sämtlichen Kaninchen kam es innerhalb von 7 Tagen nach der Injektion zum Auftreten einer Proteinurie (>200 mg Protein/24 Std.), die im Verlauf von 4 Wochen abnahm, um nach ca. 6 Wochen völlig abzuklingen. Die in Tabelle 1 zusammengefaßten experimentellen Daten zeigen, daß 12 Kaninchen in der Frühphase, d.h. innerhalb der ersten 4 Wochen starben bzw. als Folge einer Niereninsuffizienz getötet werden mußten.

Histologisch zeigten die Nieren das Bild einer diffusen, exsudativen, teilweise extrakapillären Glomerulonephritis mit Fibrinablagerungen im Glomerulum (Abb. 5). Interstitiell fanden sich lymphozytäre Infiltrationsherde entlang der größeren Gefäße und teilweise in unmittelbarer Nähe der Glomerula (Abb. 6).

Die Lokalisation von Anti-GBM in der geschädigten Niere erfolgte in unserem Fall 12 Tage nach Injektion mit Hilfe Fluoreszenz-konjugierter Antisera gegen das xenogene Ziegen IgG. Wie Abb. 7 illustriert, reagierte Anti-GBM IgG ausschließlich mit Strukturen der GBM und zeigte hier eine kontinuierliche, lineare Verteilung, die für Glomerulonephritiden vom Anti-GBM Typ charakteristisch ist (36). Etwa 5-7 Tage nach Applikation von Anti-GBM IgG synthetisierten die Empfänger Antikörper gegen Ziegen-Anti-GBM IgG, was für die sog. autologe Phase der experimentellen Anti-GBM Nephritis pathognomisch ist.

Mit Hilfe von Fluoreszenz-konjugiertem Anti-Kaninchen IgG ließ sich autologes IgG im Nierenschnitt 12 Tage nach Versuchsbeginn nachweisen (Abb.8),

Tab. 1: Glomerulonephritis bei Kaninchen nach Applikation von 20 mg Anti-GBM IgG

Zahl der Kaninchen	Stadium der Glomerulonephritis	Monate nach Injektion	Proteinurie	Zahl der Kaninchen gestorben od. getötet
49	Frühphase	0 - 1	49 ^a /49	12
37	Progressive Phase	4 - 7	20 ^b /37	20
17	Spätphase	8 - 18	1 ^b /17	0

a Zahl der Kaninchen mit Proteinurie (> 200 mg/24 Std.) / Gesamtzahl der untersuchten Tiere

b Proteinurie >100 mg/24 Std.

dessen Lokalisation entlang der GBM mit der von Ziegen Anti-GBM IgG identisch war.

Nach Ablauf der Frühphase kam es bei 20 von 37 noch verbleibenden Kaninchen 4-7 Monate nach Injektion von Anti-GBM IgG zum Wiederauftreten einer Proteinurie und, gemessen am Krankheitsverlauf, zu einer perpetuierenden GN. Innerhalb dieses Zeitraumes starben bzw. wurden 20 Kaninchen getötet, was bezogen auf die eingesetzte Kaninchenzahl einer Mortalität von 41% entsprach. Histologisch zeigten die Nieren von Kaninchen am Ende dieser progressiven Phase das Bild diffuser Glomerulonephritiden. Abb. 9a und 9b illustrieren als repräsentatives Beispiel ein Glomerulum mit proliferativen Reaktionen und ausgeprägter Hyalinisierung der Glomerulumschlingen, sowie Dilatation der tubulären Lumina. In einzelnen Fällen zeigten die Nieren das Bild interstitieller Sklerosen mit ausgedehnten Verkalkungen der Bowman'schen Kapsel und teilweise hochgradiger Verödung der Glomerula.

Immunhistologisch war das Bild zu diesem Zeitpunkt charakterisiert durch eine lineare Lokalisation von autologem IgG im Bereich noch vorhandener Reste glomerulärer und vor allem tubulärer Basalmembranen. Durch die erheblichen Veränderungen der Gewebestruktur, verbunden mit dem Eindringen von Antikörpermolekülen in zerstörte Strukturen kommt es zu einer unscharfen Fluoreszenz der Glomerula (Abb. 10) und zum Fluoreszieren von interstitiellen Gewebeanteilen.

Wie diese Verlaufsuntersuchung zeigt, starben 25% der injizierten Kaninchen in der Frühphase, während weitere 41% eine perpetuierende GN mit progressivem Charakter entwickelten und nach 4-7 Monaten niereninsuffizient wurden. Der Rest von 17 Kaninchen zeigte wohl intermittierend auftretende Proteinurien, überlebte aber bis zum Abschluß der Experimente 8-18 Monate nach Injektion von Anti-GBM IgG.

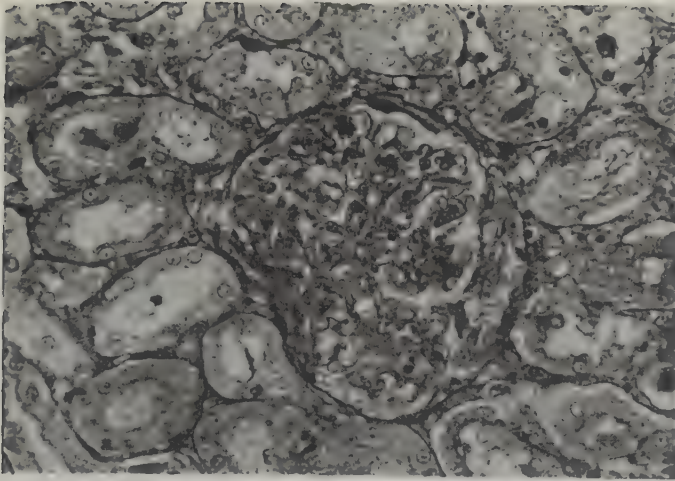


Abb. 5: Glomerulum vom Kaninchen, repräsentativ für Schädigungen der Niere 12 Tage nach Applikation von Anti-GBM IgG. Exsudative Glomerulonephritis, zusätzlich mit extrakapillärer Reaktion und Fibrinablagerungen im Glomerulum. PAS-Färbung; Vergrößerung 320 x.

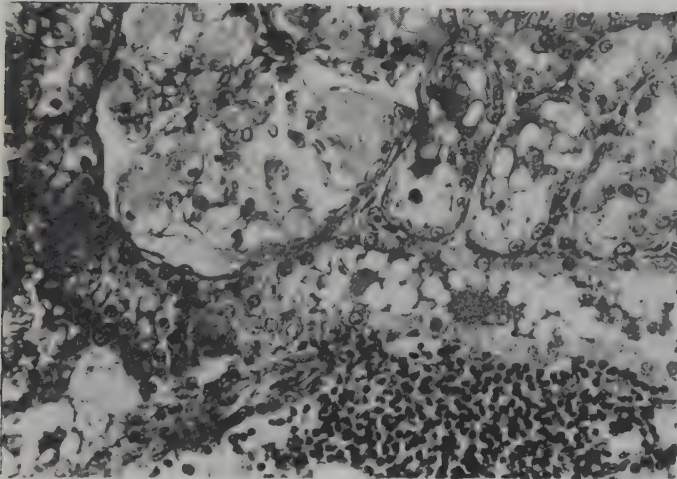


Abb. 6: Nierenschnitt von einem Kaninchen 12 Tage nach Injektion von Anti-GBM IgG. Die Abbildung ist fokussiert auf interstitielle, lymphozytäre Infiltrationsherde in Glomerulumnähe. HE-Färbung; Vergrößerung 320 x.

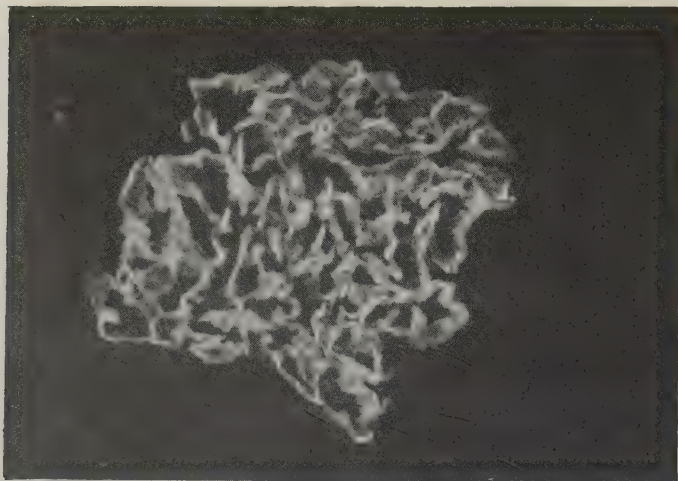


Abb. 7: Glomerulum einer Kaninchenniere, 12 Tage nach Injektion von Ziegen Anti-GBM IgG, inkubiert mit Fluoreszenz-konjugiertem Kaninchen Anti-Ziegen IgG. Die Abbildung zeigt eine kontinuierliche, lineare Lokalisation von Anti-GBM IgG entlang der GBM. Vergrößerung 320 x.

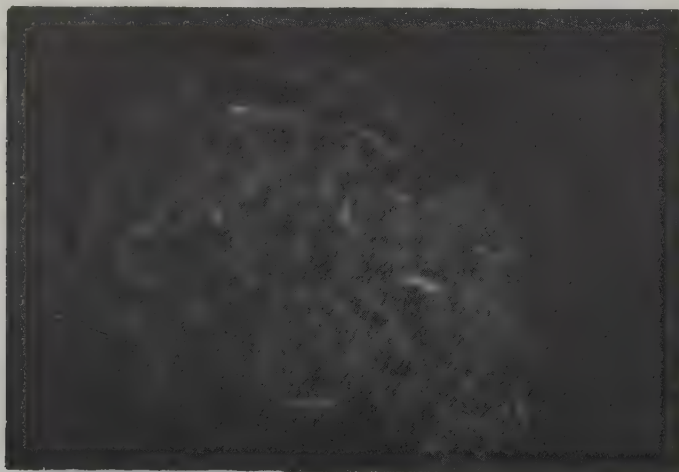


Abb. 8: Glomerulum einer Kaninchenniere, 12 Tage nach Injektion von Ziegen Anti-GBM IgG, inkubiert mit Fluoreszenz-konjugiertem Ziegen Anti-Kaninchen IgG. Die Abbildung zeigt eine lineare Lokalisation von Kaninchen IgG entlang der GBM. Vergrößerung 320 x.

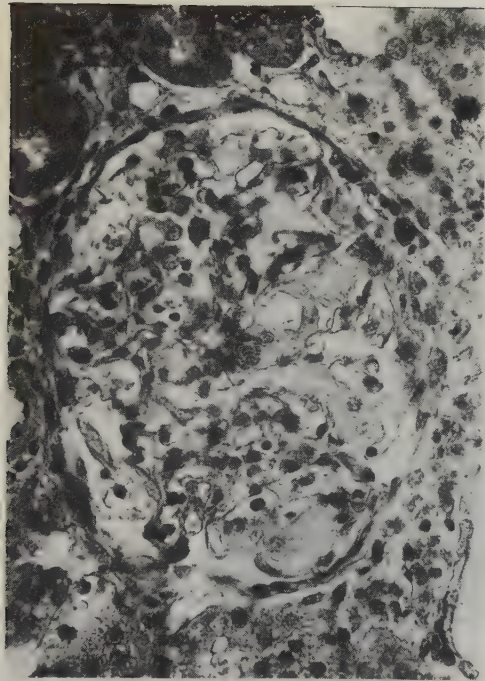


Abb. 9a

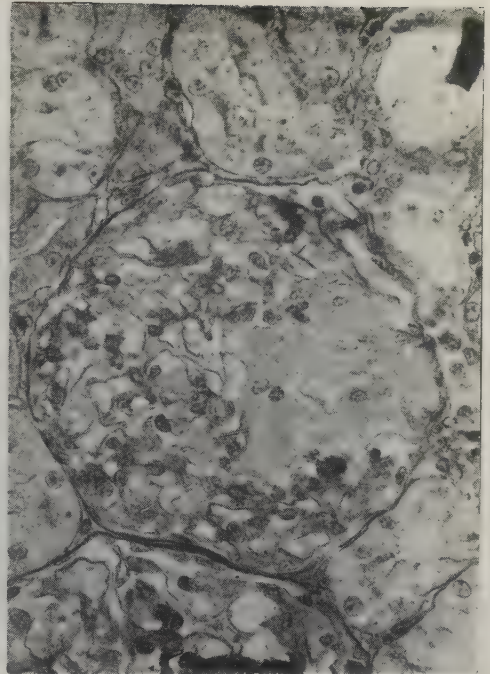


Abb. 9b

Glomerulum vom Kaninchen, repräsentativ für Schädigungen der Niere 7 Monate nach Injektion von Anti-GBM IgG. Das Bild zeigt eine proliferative Glomerulonephritis mit ausgeprägter Hyalinisierung der Glomerulumschlingen. HE-Färbung (9a), PAS-Färbung (9b); Vergrößerung 320 x.

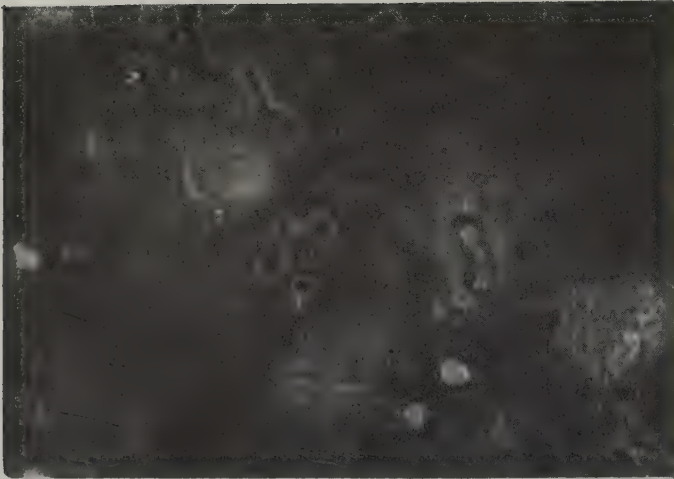


Abb. 10: Glomerula vom Kaninchen, 8 Monate nach Injektion von Ziegen Anti-GBM IgG, inkubiert mit Fluoreszenz-konjugiertem Ziegen Anti-Kaninchen IgG. Teilweise lineare Lokalisation von autologem IgG im Bereich noch vorhandener glomerulärer und tubulärer Basalmembranen und schwacher Fluoreszenz des Interstitiums.

3.6. Anreicherung und Reinigung von GBM-Fragmenten aus dem Urin nephritischer Kaninchen.

3.6.1. Ionenaustauscherchromatographie

Urin nephritischer Kaninchen wurde zentrifugiert, filtriert und konzentriert, und anschließend gegen Startpuffer dialysiert. In einer repräsentativen Chromatographie wurden 4 g Protein in 2% Lösung auf DEAE-Cellulose aufgetragen und stufenweise mit Puffern steigender Ionenstärke bei konstantem pH von 8,0 eluiert. (Abb. 11).

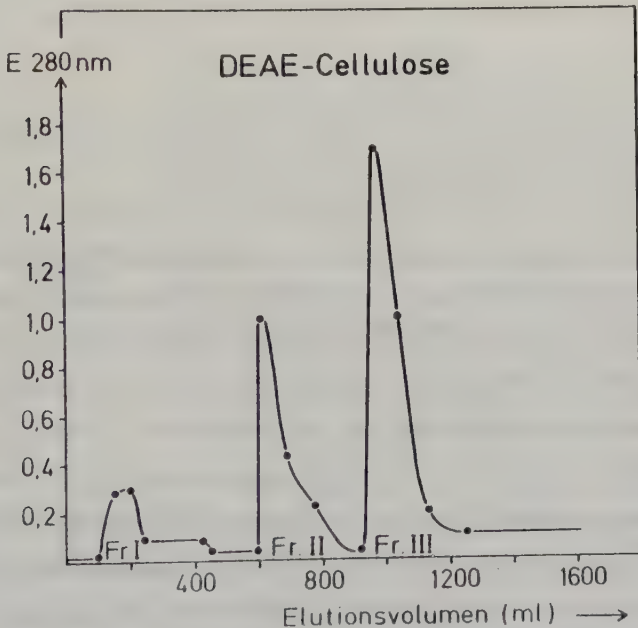


Abb. 11: Chromatographie von Urin nephritischer Kaninchen an DEAE-Cellulose, äquilibriert gegen 0,0175 M Phosphatpuffer, pH 8,0. Stufenweise Elution mit 0,07 M und 1,0 M Phosphatpuffer.

Die Lokalisation von GBM-Fragmenten in Fraktion I und II wurde immunologisch mit Hilfe von Anti-GBM IgG nachgewiesen.

Als Grundpuffer wurde 0,0175 M Phosphatpuffer eingesetzt und die Molarität durch Zugabe von NaCl auf 0,07 M bzw. 1,0 M gebracht. Unter diesen Bedingungen wurden drei Fraktionen erhalten, deren Proteinzusammensetzung mit Hilfe von Schaf Anti-Kaninchenserum in der Immunelektrophorese analysiert wurde. Zusätzlich wurden die Fraktionen auf das Vorhandensein von GBM-Fragmenten geprüft.

Wie Abb. 12 zeigt, enthielten lediglich Fraktion I und II GBM-Fragmente, die, obwohl unterschiedlich in der Ladung, immunologisch identisch waren. Gemessen an der eingesetzten Proteinkonzentration war der Gehalt an GBM-Fragmenten in Fraktion I signifikant höher als in Fraktion II.



Abb. 12: Immunologische Analyse von Urin nephritischer Kaninchen nach Chromatographie an DEAE-Cellulose, Fraktion I: 10 mg Protein/ml (1) und Fraktion II: 30 mg Protein/ml (2). (A) Anti-GBM IgG.

Wie die immunelektrophoretische Analyse in Abbildung 13 zeigt, wies der Urin nephritischer Kaninchen eine Proteinzusammensetzung auf, die nahezu dem Spektrum eines Kaninchensерums entsprach. Die durch Chromatographie an DEAE-Cellulose erhaltene Fraktion I enthielt im Wesentlichen zwei Proteinkomponenten mit den Wanderungseigenschaften von IgG bzw. dessen Spaltprodukten und Transferrin. Dieser Befund sprach dafür, daß es durch Chromatographie von Urin an DEAE-Cellulose gelang, mit Ausnahme der vor- genannten Proteinkomponenten, das übrige Spektrum von Serumweiß ab- zureichern.

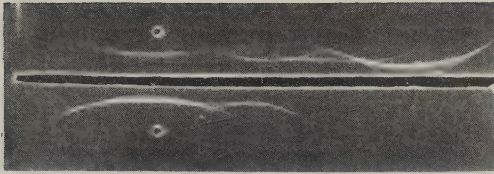


Abb. 13: Immunelektrophoretische Analyse von Urin nephritischer Kaninchen vor und nach Chromatographie an DEAE-Cellulose.

Oberes Loch: Originaler Urin. Unteres Loch: DEAE-Fraktion I.

Rinne: Anti-Kaninchenserum vom Schaf. Anode rechts.

In Fraktion I wurden im Durchschnitt von der eingesetzten Proteinmenge (4 g) 190 mg wiedergefunden, was einer Ausbeute von 4,7% entsprach.

3.6.2. Gelfiltration von Sephadex G-100

Zur weiteren Anreicherung von GBM-Fragmenten wurde DEAE-Fraktion I an Sephadex G-100 chromatographiert. Zu diesem Zweck wurden 156 mg Protein in einer 2,5%igen Lösung auf die Gelmatrix aufgetragen und mit Tris-Glycinpuffer eluiert. Das Elutionsprofil (Abb. 14) wurde in 5 Fraktionen (I-V) eingeteilt, die auf das Vorhandensein von GBM-Fragmenten geprüft wurden.

Von 156 mg Protein wurden insgesamt 140 mg wiedergefunden, was einer Ausbeute von 93% entsprach.

Mit Hilfe von Anti-GBM IgG ließen sich GBM-Fragmente lediglich in Fraktion II und Fraktion III lokalisieren.

Durch immunelektrophoretische Analysen ließ sich zeigen, daß die Chromatographie von DEAE-Fraktion I an Sephadex G-100 zu einer signifikanten Anreicherung von Immunglobulinen führte.

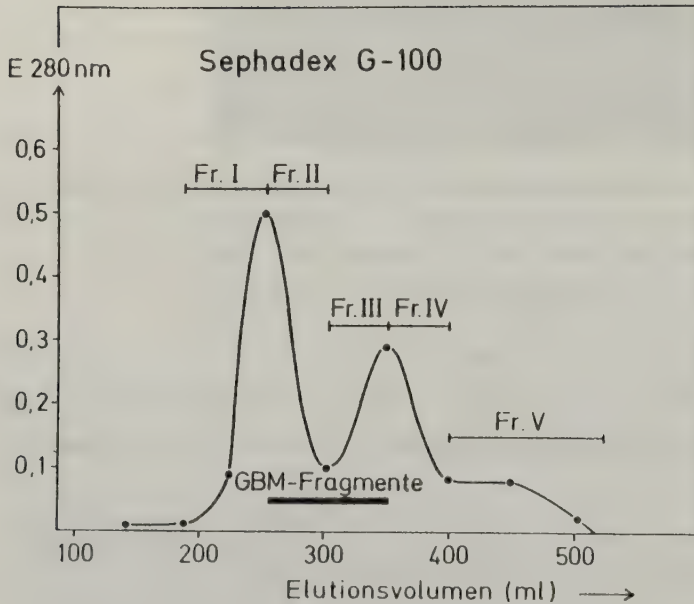


Abb. 14: Gelfiltration von Urin nephritischer Kaninchen nach Chromatographie an DEAE-Cellulose (Fraktion I) an Sephadex G-100. Die Lokalisation von GBM-Fragmenten, die im Diagramm wiedergegeben ist, wurde immunologisch mit Anti-GBM IgG nachgewiesen.

Die beiden Fragmente wurden vereinigt und das Gesamtprotein mit 65 mg bestimmt, d.h. die Ausbeute lag bei 41% der eingesetzten Proteinmenge.

3.6.3. Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose

Zur weiteren Abreicherung von IgG und IgG-Fragmenten wurden Fraktion II und III nach Gelfiltration an Sephadex G-100 vereinigt, insgesamt 63 mg Protein auf Protein A-Sepharose aufgetragen und nicht absorbiertes Material (Fraktion I) mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2, eluiert.

Anschließend erfolgte die Desorption des gebundenen Proteins (Fraktion II) mit 0,1 M Glycin-HCl, pH 3,0 (Abb. 15).

Durch weiteres Waschen der Gelmatrix mit Phosphatpuffer wurde eine dritte Fraktion (Fraktion III) erhalten, die mit Fraktion II vereinigt wurde. Fraktion I enthielt 26 mg und Fraktion II/III 35 mg Protein, was einer Gesamtausbeute von 98% entsprach.

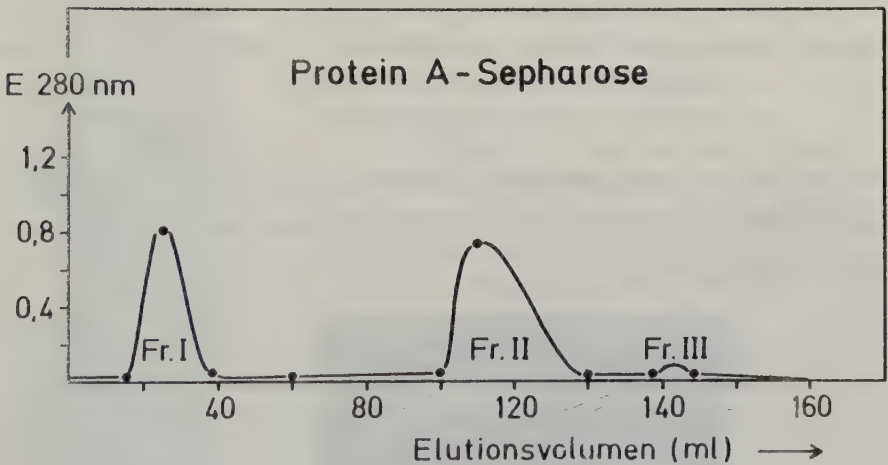


Abb. 15: Chromatographie von Urin nephritischer Kaninchen nach Gelfiltration an Sephadex G-100 (Fraktion II und III vereinigt) an Protein A-Sephrose 6 B. Das aufgetragene Material wurde in der ersten Stufe eluiert mit 0,1 M NaH_2PO_4 , pH 7,2 und anschließend mit 0,1 M Glycin-HCl, pH 3,0. Die Analyse von Fraktion I und II/III auf das Vorhandensein von GBM-Fragmenten erfolgte immunologisch mit Anti-GBM IgG.

Durch Abbildung 16 wird dokumentiert, daß GBM-Fragmente an Protein A-Sepharose nicht absorbieren, d.h. somit ausschließlich in Fraktion I enthalten und damit weitgehend angereichert sind. Diese Fraktion wurde in den unter 3.7. beschriebenen Versuchen als Urin-GBM eingesetzt. Mit Fraktion II/III hingegen waren IgG und H-Kettenfragmente assoziiert. (Nicht in der Abbildung enthalten).

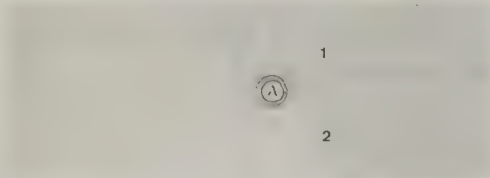


Abb. 16: Immunologische Analyse von Fraktion I (1) und II (2) nach Chromatographie an Protein A-Sepharose. (A) Anti-GBM IgG.

Die immunoelektrophoretische Analyse von Fraktion I (Abb. 17) zeigt als Hauptkomponente Transferrin, daneben aber eine deutliche Abreicherung von IgG und IgG-Fragmenten.

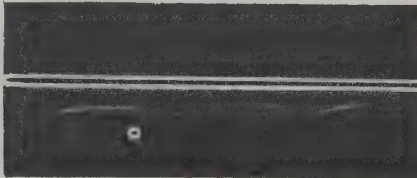


Abb. 17: Immunelektrophoretische Analyse von Fraktion I nach Protein A-Sepharose.

Oberes Loch: Fraktion I. Unteres Loch: NKS. Rinne: Anti-Kaninchenserum vom Schaf. Anode rechts.

In der analytischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte die GBM-Fragmente-enhaltende Fraktion I nach Chromatographie an Protein A-Sephrose noch 6 Banden (Abb. 18), was für die Heterogenität dieser Fraktion spricht. Gemessen an der relativen Wanderung der Referenzproteine handelt es sich hierbei ausschließlich um Komponenten mit Molgewichten unter 100 000.

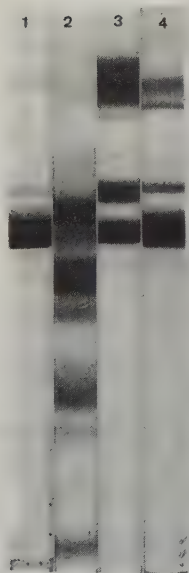


Abb. 18: Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Urin GBM Fragmenten nach Chromatographie an Protein A-Sephrose.

- 1) Originaler Urin (nicht fraktioniert)
- 2) Urin-GBM Fraktion I nach Chromatographie an Protein A-Sephrose
- 3) Referenzproteine: Kaninchen-IgG, MG 150.000 (59); Human-Transferrin, MG 77.000 (42); Kaninchenserumalbumin, MG 69.000 (59)

4) Kaninchenserum

7,5% Gel in Gegenwart von 0,1% Natriumdodecylsulfat.

Aufgetragene Proteinmengen: 20-180 μ g/10 μ l.

3.6.4. Affinitätschromatographie an Anti-Kaninchen IgG-Sephrose

Mit dem Ziel, IgG und IgG-Spaltprodukte aus der GBM-haltigen Fraktion quantitativ zu entfernen, wurden probeweise 5 mg Fraktion I, eluiert von Protein A-Sephrose, an Anti-Kaninchen IgG-Sephrose chromatographiert. Zur Elution von nicht gebundenem und gebundenem Protein wurden die in

Kapitel 3,6,3, bereits geschriebenen Puffer benutzt. Die mit Phosphatpuffer erhaltene Fraktion I enthielt, wie die Immunelektrophorese in Abbildung 19 zeigt, als Hauptkomponente Transferrin und nur noch Spuren von Proteinen, die im IgG-Bereich wanderten.

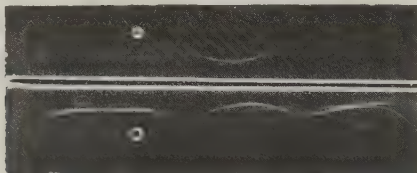


Abb. 19: Immunelektrophoretische Analyse von Fraktion I nach Chromatographie an Anti-Kaninchen IgG Sepharose.

Oberes Loch: Fraktion I. Unteres Loch: NKS. Rinne: Anti-Kaninchenserum vom Schaf. Anode rechts.

GBM-Fragmente waren ausschließlich mit Fraktion I assoziiert, während die mit Glycin-HCl Puffer eluierte Fraktion II frei von GBM-Fragmenten war.

Da diese Chromatographie im Vergleich zu der Chromatographie an Protein A-Sepharose hinsichtlich der Anreicherung von GBM-Fragmenten keinen Vorteil zu bringen schien, wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

3.6.5. Hydrophobe Chromatographie

Zur Entfernung von Transferrin aus GBM-haltigen Fraktionen wurde die hydrophobe Chromatographie eingesetzt, ein Verfahren, das es gestattet, Proteine nach hydrophoben Eigenschaften zu trennen.

GBM-haltige Fraktionen wurden auf L-Phenylalanin-Sepharose aufgetragen und Proteine durch stufenweise Reduktion der Salzkonzentration

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in Tris-Acetat Puffer nach dem von Doellgast und Plaut (15) beschriebenen Verfahren eluiert. Da eine Trennung von GBM-Fragmenten und Transferrin auf diese Weise nicht gelang, wurde auch diese Methode nicht weiter verfolgt.

3.7. Stimulierung zirkulierender Lymphozyten nephritischer Kaninchen in vitro mit enzymatischen Spaltprodukten der GBM.

Es war das Ziel dieser Untersuchungen zu prüfen, ob und zu welchem Zeitpunkt zellvermittelte Immunreaktionen im Verlauf einer experimentellen Nephritis eine mögliche pathogenetische Rolle spielen. In diesem Zusammenhang wurden GBM-Fragmente auf ihre Fähigkeit untersucht, zirkulierende Lymphozyten nephritischer Kaninchen zu stimulieren als ein in vitro-Korrelat zur zellvermittelten Reaktion mit Strukturen der GBM.

Die Gewinnung der Lymphozyten erfolgte innerhalb eines Zeitraumes zwischen 12 Tagen und 15 Monaten nach Applikation von Anti-GBM IgG. Die in Tabelle 2 zusammengefaßten Daten zeigen, daß innerhalb der nephritischen Frühphase bei allen Kaninchen eine starke Proteinurie bestand. In dieser Frühphase ließen sich zirkulierende Lymphozyten aller getesteten Tiere mit CGBM, nicht jedoch mit TGBM, stimulieren bis zu einem maximalen Stimulierungsverhältnis von 31. PHA induzierte in allen Fällen eine Zellproliferation und diente gleichzeitig als maximale Stimulierungskontrolle.

Tabelle 2

In vitro Stimulierung zirkulierender Lymphozyten von nephritischen Kaninchen (10-20 Tage nach Applikation von Anti-GBM-Antikörpern) mit GBM-Fragmenten und PHA.

Gruppe 1 Kan. Nr.	Tage nach Anti-GBM ^a	Protein- urie	Stimulierungsverhältnis ^b nach Aktivierung mit		
			TGBM (16 µg)	GBM (16 µg)	PHA (10 µg)
428	12	++ ^c	1,0	6,2	8,9
458	12	++	0,4	13,5	78,2
457	12	++	0,4	3,3	14,1
431	12	++	0,5	6,6	19,5
425	19	++	0,4	31,0	294,4
299	Kontrolle	-	0,8	0,9	16,9

^a Anti-GBM IgG von der Ziege

^c Proteinurie (200 mg Protein/24 Std)

^b Stimulierungsverhältnis = $\frac{\text{CPM Kultur mit Antigen}}{\text{CPM Kultur ohne Antigen}}$

Tabelle 3: In vitro Stimulierung zirkulierender Lymphozyten von nephritischen Kaninchen (1-4 Monate nach Applikation von Anti-GBM Antikörpern) mit GBM-Fragmenten und PHA.

Gruppe 2 Kan. Nr.	Monate nach Anti-GBM ^a	Protein- urie	Stimulierungsverhältnis ^b nach Aktivierung mit			
			TGBM (16 µg)	CGBM (16 µg)	Urin-GBM (70 µg)	PHA (10 µg)
932	1,5	- ^c	2,2	0,9	n.u.	22,9
931	2	-	0,5	1,8	n.u.	28,1
476	3	-	1,2	3,6	n.u.	79,7
737	3	-	0,4	3,6	n.u.	42,7
589	3	-	0,7	19,6	n.u.	54,0
776	3	-	1,3	3,4	n.u.	94,1
773	4	-	4,4	2,2	1,9	22,3
789	Kontrolle	-	1,0	1,1	n.u.	68,9

a,b siehe Tabelle 1

c keine Proteinurie

n.u. nicht untersucht

Tabelle 4: In vitro Stimulierung zirkulierender Lymphozyten von nephritischen Kaninchen (8-15 Monate nach Applikation von Anti-GBM Antikörpern) mit GBM-Fragmenten und PHA

Gruppe 3 Kan.Nr.	Monate nach Anti-GBM ^a	Protein- urie	Stimulierungsverhältnis ^b nach Aktivierung mit			
			TGBM (16 µg)	CGBM (16 µg)	Urin-GBM (70 µg)	PHA (10 µg)
428	8	-	33,6	0,4	n. u.	27,5
432	8	+ ^c	0,6	5,2	0,7	100,0
457	8	- ^d	0,7	0,6	n. u.	17,9
458	8	-	0,5	0,8	n. u.	35,5
270	10	-	7,6	1,5	n. u.	9,7
432	11,5	+	0,4	0,3	19,7	42,4
959	12	-	0,4	1,5	5,2	24,9
883	15	-	0,6	0,7	2,0	47,5
793	Kontrolle	-	0,9	0,7	0,9	25,1

a, b siehe Tab. 1

c Proteinurie (< 100 mg Protein/24 Std)

d keine Proteinurie

n.u. nicht untersucht

In der progressiven Phase, d.h. 1-4 Monate nach Applikation von Anti-GBM IgG, zeigten die Lymphozyten eine verminderte Reaktivität gegenüber CGBM (Tab. 3). Im Gegensatz zur Frühphase jedoch ließen sich in der progressiven Phase die Lymphozyten einzelner Kaninchen (Nr. 476, Nr. 776, Nr. 773) mit TGBM stimulieren. Sämtliche Kaninchen zeigten zum Zeitpunkt der Untersuchung keine meßbare Proteinurie.

Die in Tabelle 4 zusammengefaßten experimentellen Daten machen deutlich, daß Lymphozyten von Kaninchen im nephritischen Spätstadium, mit zwei Ausnahmen (Kaninchen Nr. 432 und Nr. 270) sich durch CGBM nicht stimulieren ließen. Repräsentative Beispiele hierfür sind die Kaninchen Nr. 428, Nr. 458 und Nr. 457), deren Lymphozyten in der Frühphase, nicht jedoch in der Spätphase, mit CGBM reagierten. Demgegenüber führte der Kontakt zwischen Lymphozyten von Kaninchen Nr. 428 und Nr. 270 und TGBM zu einer ausgeprägten Stimulierung. Dabei zeigte sich, daß die Stimulierbarkeit von Lymphozyten nicht mit der Proteinausscheidung korreliert war.

Urin-GBM (Fraktion I nach Protein A-Sepharose) konnte aus Materialmangel nur in der Spätphase und einmal in der progressiven Phase getestet werden.

Es zeigte sich bei Kaninchen Nr. 432, 959 und 883 eine deutliche Stimulierung mit Urin-GBM (Tab. 4), ebenso bei dem in der progressiven Phase untersuchten Kaninchen Nr. 773 (Tab. 3).

Die Lymphozyten von Kontrolltieren, die kein Anti-GBM IgG erhielten oder mit normalem Ziegen-IgG injiziert wurden, zeigten mit keinem der drei Antigene eine Stimulation.

4. Diskussion

Spontan auftretende Glomerulonephritiden sind in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen gewesen. Dabei konnte gezeigt werden, daß vornehmlich im Glomerulum selbst sich abspielende immunologische Reaktionen die Basis für die Nierenschädigung sind. Etwa 10% menschlicher Glomerulonephritiden werden durch Antikörper verursacht, die gegen Strukturen der GBM selbst gerichtet sind und mit diesen unmittelbar reagieren. (Anti-GBM Typ der GN) (39). Repräsentativ dafür sind die mit dem Goodpasture Syndrom verbundenen GN sowie einige Fälle von progressiv verlaufenden GN. Für diesen Anti-GBM Typ der Nephritis ist die kontinuierliche, lineare Lokalisation von Anti-GBM Molekülen entlang der GBM auf der endothelialen Seite charakteristisch.

Experimentell ist es gelungen, mit Anti-GBM Antikörpern, die von nephritisch veränderten, menschlichen Nieren dissoziiert wurden, durch Übertragung auf Primaten eine protrahiert verlaufende GN zu induzieren, was als überzeugender Beweis für die pathogenetische Bedeutung dieser Antikörper gewertet wird (32). Wenig hingegen ist bekannt über die primären Insulte, als deren Folge es zur Synthese von Anti-GBM Antikörpern kommt (71). Als auslösende Faktoren für die Bildung von Anti-GBM Antikörpern können xenogene Antigene wie Chemikalien oder Mikroorganismen in Betracht kommen, oder solche Strukturen, die mit der GBM kreuzreagieren.

So zeigen unsere eigenen Untersuchungen, daß es in der Ziege relativ leicht gelingt, durch Immunisierung mit xenogener (Kaninchen-)GBM Antikörper zu erzeugen, die offenbar mit der GBM reagieren und zu einer progressiven GN führen, die in der Regel nach Ablauf von 8 Monaten tödlich endet.

Dieses experimentelle Modell besitzt im Hinblick auf den zeitlichen Ablauf und die Morphologie der Nierenschädigung (proliferativ-sklerotisierend) große Ähnlichkeit mit der menschlichen GN vom Anti-GBM Typ. Analog hierzu wurden auch bei Schafen, und zwar im allogenen und xeno-genen System, glomeruläre Schädigungen beobachtet, die durch eine lineare Lokalisation von Anti-GBM Antikörpern im Bereich der GBM gekennzeichnet waren (64).

Von Bedeutung für die Pathogenese ist dabei:

- a) daß kreuzreagierende Antigenstrukturen zum Brechen der Toleranz und in der Folge zur Immunisierung gegen die eigene GBM, d.h. zu einer Autoimmunantwort führen, und
- b) daß im Gegensatz zu Kaninchen und Ratte sich bei Ziege und Schaf eine GN vom Anti-GBM Typ besonders leicht auslösen läßt.

So genügen z.B. beim Schaf 5 µg nierenfixierende Antikörper pro g Niere zur Induktion einer GN, während bei Kaninchen hierfür 75 µg notwendig sind. (74). Die Ursachen dürften sehr komplexer Art sein. Manches spricht dafür, daß die normalen Stoffwechselprodukte von Basalmembranen als Tolerogene die immunologische Reaktion gegen körpereigene Konstituenten blockieren (20,38). Obwohl der experimentelle Beweis noch aussteht, muß man doch von der Annahme ausgehen, daß entweder eine Erhöhung der Konzentration von Spaltprodukten der Basalmembran im Serum oder das Auftreten chemisch modifizierter GBM-Strukturen die Bildung von Anti-GBM Antikörpern induzieren können (46,31).

Die chemische Analyse der GBM hat gezeigt, daß es sich um ein Glykoprotein handelt, das sich a) aus einem kollagenähnlichen Glykopeptid mit Disaccha-

ridketten und b) aus nicht-kollagenen Peptidstrukturen mit Heteropolysaccharideinheiten (sog. Sialoprotein) zusammensetzt (62,26).

In der Mehrzahl sprechen die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen dafür, daß die nephritogenen Eigenschaften mit dem nicht-kollagenen Glykoprotein (Heteropolysaccharid) assoziiert sind (66,23,56,58).

Wie die eigenen Untersuchungen am klassischen Modell der experimentellen GN am Kaninchen zeigen, reagieren xenogene Ziegen Anti-GBM Antikörper ausschließlich mit Strukturen der GBM, was in der Folge zu einer Modifikation nativer Strukturen führt. Die nach 5-7 Tagen auftretenden Proteinurien sind mit schweren glomerulären Schädigungen verbunden (Abb. 5) und stimmen zeitlich überein mit der Lokalisation von autologem Kaninchen IgG entlang der GBM. Zwei Indizien sprechen dafür, daß es sich hierbei um autologe Antikörper gegen Ziegen IgG handelt: a) die immunhistologisch dokumentierte Lokalisation von Kaninchen IgG ist mit der von Anti-GBM IgG identisch und b) in Kaninchen, tolerant gegen xenogenes Anti-GBM IgG ist eine entsprechende Lokalisation nicht nachweisbar (19). Bei über 40% der Kaninchen kam es zu einer progressiven, perpetuierenden GN, die innerhalb von 4-7 Monaten zur Niereninsuffizienz führte. 34% der Tiere zeigten zum Teil rezidivierende Proteinurien, überlebten jedoch bis zum Abschluß der Experimente, d.h. 8-18 Monate nach Versuchsbeginn. Da alle Kaninchen die gleiche Dosis Anti-GBM Antikörper erhielten, besteht Grund zu der Annahme, daß die Progression der Nierenschädigung mit dem Grad der Immunantwort korreliert ist.

Da xenogene Anti-GBM Antikörper bereits 3-4 Wochen nach der Applikation vollständig von der GBM dissoziiert sind (55), ist es unwahrscheinlich, daß die Progression der Nierenschädigung durch Antikörper bestimmt wird,

die gegen xenogenes Anti-GBM IgG gerichtet sind. Die Mannigfaltigkeit der pathologischen Nierenveränderungen (diffuse, proliferative GN mit teilweise weitgehender Verödung der Glomerula, tubuläre Dilatation, ausgedehnte lymphozytäre Infiltrationsherde im Interstitium) sowie das immunhistologisch nachweisbare Kaninchen IgG im Bereich der glomerulären und tubulären Membran und im Interstitium sprechen vielmehr dafür, daß Antikörper gegen a) modifizierte Nierenantigene oder b) im Serum angereichertes nephritogenes Material für die Progression der Nierenschädigung verantwortlich sind. Diese These wird gestützt durch die Tatsache, daß bei spontan auftretenden und experimentellen GN vermehrt Basalmembranfragmente durch die Niere ausgeschieden werden (20,6), die bereits im Normalurin als Stoffwechselprodukte von Basalmembranen in geringen Konzentrationen vorkommen (37 und potentiell nephritogen sind (33,53). Es ist deshalb denkbar, daß es auf dem Weg über eine entsprechende Anreicherung von GBM-Fragmenten im Serum zur Bildung von Anti-GBM Antikörpern und als Folge davon zu einer progressiven Nierenschädigung kommt.

Lösliche Abbauprodukte der GBM, wie sie unter pathologischen Bedingungen durch Einwirkung lysosomaler Enzyme entstehen und im Urin nachgewiesen werden können (20,30), sind sehr wahrscheinlich für den perpetuierenden Prozeß der Nierenschädigung verantwortlich. Diese Fragmente sind sicher nicht identisch mit Spaltprodukten, die durch enzymatischen Abbau der partikulären GBM mit Trypsin- oder Collagenase entstehen. Über die Kombination von Ionenaustauscher, Gelfiltration und Affinitätschromatographien an Protein A-Sepharose gelang es, GBM-Fragmente weitgehend anzureichern, jedoch nicht vollständig zu reinigen. Die angereicherte Fraktion enthielt noch Spuren von Transferrin und IgG-Fragmenten und reagierte spezifisch mit Anti-GBM IgG, d.h. Antikörpern, die im Kaninchen GN induzieren. Einige Versuche anderer Autoren (38,41), GBM-Fragmente aus Normalurin rein darzustellen, führten zu keinem großen Erfolg.

Das Verhalten der angereicherten GBM-Fragmente an der hydrophoben Gel-matrix sowie in Gegenwart ionisierender Detergentien in der analytischen Disk-Elektrophorese spricht für die Heterogenität des Präparates. Im Vergleich mit anderen Autoren (38,6) hat in unserem System der größte Anteil der im Urin nephritischer Kaninchen vorkommenden Kaninchen GBM-Fragmente mehr basischen Charakter. Es läßt sich zeigen, daß GBM-Fragmente aus dem Urin nephritischer Kaninchen mit enzymatischen Spaltprodukten der partikulären GBM kreuzreagieren. Da TGBM nicht-kollagenes Glykoprotein (Heteropolysaccharid) enthält und CGBM Komponenten, die überwiegend aus der kollagenen Matrix stammen (Disaccharid), kann die Kreuzreaktion dadurch erklärt werden, daß beide Strukturen als Bauelemente in der GBM enthalten sind und im Urin nephritischer Kaninchen auftreten. Die geplante chemische Analyse dieser unter pathologischen Bedingungen entstehenden Fragmente, würde wesentlich zur Klärung der Entstehung von Nephritiden des Anti-GBM Typs beitragen.

Wenn auch die Bedeutung der humoralen Immunantwort für die Frühphase der experimentell induzierten Anti-GBM Nephritis unbestritten ist, so stellt sich doch die Frage, ob die Progression der GN nicht zusätzliche Mechanismen erfordert, die für die tiefgreifenden Schädigungen des Nierengewebes mit verantwortlich sind.

Augenblicklich gibt es noch keine ausreichenden Beweise, daß es sich hierbei um eine Beteiligung zellvermittelter Reaktionen handelt, da a) lymphozytäre Infiltrationen im Glomerulum oder in dessen unmittelbarer Nähe bei spontanen Anti-GBM Nephritiden nicht zu den konstanten Befunden gehören (65,50) und b) der experimentelle Beweis noch aussteht, daß glomeruläre Strukturen direkt durch Lymphotoxine geschädigt werden können (13).

Unsere Untersuchungen dokumentieren jedoch, daß lymphozytäre Infiltrationsherde teilweise in unmittelbarer Nachbarschaft der Glomerula schon in der Frühphase, vornehmlich aber bei der progressiven Nierenschädigung auftreten. Durch ähnliche Befunde veranlaßt, wurde bereits vor Jahren versucht, in einem isogenen Spender/Empfängersystem experimentelle GN mit Lymphozyten auf gesunde Parabionten zu übertragen (49). Die Interpretation, daß lymphozytäre Mediatoren für Übertragung und Progression der GN verantwortlich sind, ist jedoch umstritten, da ein simultaner Transfer von antikörperbildenden Zellen und/oder geringer Mengen von GBM-Antigenen nicht ausgeschlossen werden konnte. Für eine Beteiligung zellulärer Mechanismen spricht die Tatsache, daß Lymphozyten von Patienten mit Anti-GBM Nephritiden mit GBM Antigenen in vitro spezifisch reagieren (50,8,37). Wie unsere eigenen Untersuchungen beweisen, treten in der Frühphase experimenteller GN sensibilisierte Lymphozyten auf, die sich in vitro bevorzugt mit CGBM und sehr viel weniger ausgeprägt mit TGBM stimulieren lassen. Bemerkenswert ist jedoch, daß bei der überwiegenden Zahl nephritischer Kaninchen in der progressiven Phase Lymphozyten auftreten, die mit tryptischen Abbauprodukten der GBM spezifisch reagieren. Da Urin-GBM-enthaltende Fraktionen nur in kleinen Mengen zur Verfügung standen, mußten die Stimulierungsversuche auf die nephritische Spätphase beschränkt werden. Die experimentellen Daten sprechen jedoch dafür, daß Lymphozyten nephritischer, nicht aber gesunder Kaninchen mit löslichen GBM-Fragmenten aus nephritischem Urin reagieren. In diesem Zusammenhang ist nicht völlig auszuschließen, daß eine Stimulierung von Lymphozyten auch prinzipiell durch Immunkomplexe möglich ist, die sich während der Inkubation in der Mikrokultur bilden können.

Besonders ist darauf hinzuweisen, daß die progressive Phase der Anti-GBM

Nephritis beim Kaninchen mit sensibilisierten Lymphozyten assoziiert ist, die sich bevorzugt durch TGBM stimulieren lassen. Aus anderen Untersuchungen ist zu entnehmen, daß nicht-kollagene Heteropolysaccharid-Strukturen für die Bildung nephrotoxischer Antikörper verantwortlich sind (58). Wie bereits erwähnt, werden die Antigen-Determinanten der TGBM durch diese Strukturen repräsentiert. Es ist also anzunehmen, daß beim Kaninchen sowohl Lymphozyten als auch die Bildung nephrotoxischer Antikörper durch die gleichen glomerulären Spaltprodukte stimuliert werden.

Im Gegensatz hierzu könnten noch umstrittene Befunde bei Patienten mit Anti-GBM Nephritiden jedoch für eine Beteiligung disaccharidhaltiger kollagener Glykoproteinstrukturen an Autosensibilisierungsprozessen sprechen (40).

Auf Grund unserer Ergebnisse läßt sich vermuten, daß möglicherweise zellvermittelte Reaktionen für die Progression der experimentellen GN pathogenetisch bedeutsam sind.

Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, ist die experimentelle Anti-GBM Nephritis ein besonders geeignetes Modell, um die Bedeutung humoraler und zellvermittelter Mechanismen für progressive Nierenschädigung zu analysieren.

5. Zusammenfassung

Die Immunisierung von Ziegen mit glomerulären Basalmembranen (GBM) von Kaninchen führte zur Bildung autologer Anti-GBM Antikörper, assoziiert mit einer diffusen, proliferativen Glomerulonephritis mit progressiver Niereninauffizienz. Die passive Übertragung von Ziegen Anti-GBM Antikörpern auf Kaninchen, d.h. die GBM-Spenderspezies, führte nach 5-7 Tagen zu glomerulären Schädigungen mit ausgeprägter Proteinurie, bedingt durch die Lokalisation von Autoantikörpern gegen Anti-GBM IgG entlang der GBM. Bei über 40% der Kaninchen kam es zu progressiven Nierenschädigungen, und innerhalb von 4-7 Monaten zur Niereninsuffizienz.

Als Folge der glomerulären Schädigung entstehen vermehrt lösliche Fragmente der GBM, die im Urin nephritischer Kaninchen akkumulieren und sich als nephritogen erweisen. Durch die Kombination chromatographischer Verfahren, d.h. Ionenaustauscher, Gelfiltration und Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose gelang es, aus dem Urin nephritischer Kaninchen GBM-Fragmente anzureichern. Das angereicherte Material präzipitierte spezifisch mit Anti-GBM IgG und zeigte immunologisch partielle Identität mit löslichen Spaltprodukten der partikulären GBM, die durch Trypsin (TGBM)- bzw. Collagenase (CGBM)-Abbau gewonnen wurden.

Durch Verlaufsuntersuchungen wurde experimentell bewiesen, daß periphere Lymphozyten nephritischer Kaninchen mit GBM Antigenstrukturen spezifisch reagieren, d.h. während der akuten glomerulären Attacke vornehmlich mit Disaccharid-enthaltenden, kollagenähnlichen Glykoproteinen und im Verlauf der progressiven Phase bevorzugt mit Heteropolysaccharid-haltigen, nicht-kollagenen Strukturen. Durch wenige, gezielte Experimente ließ sich

zeigen, daß auch GBM-Fragmente aus dem Urin eine Blasttransformation sensibilisierter Lymphozyten bewirken. Die Ergebnisse lassen die Existenz zellvermittelter Immunreaktionen vermuten, die für progressive Nierenschädigungen von pathogenetischer Bedeutung sein könnten.

Summary

Induction of autologous anti-glomerular basement membrane (anti-GBM) antibodies by immunization of goats with rabbit GBM was accompanied by a self perpetuating glomerulonephritis (GN) with progressive renal failure. The transfer of goat anti-GBM antibodies to rabbits, the species donating the GBM used for immunization, induced GN with marked proteinuria which developed 5 to 7 days after injection. The glomerular injury coincided with deposits of autoantibody presumably against anti-GBM IgG outlining the GBM in a linear fashion. More than 40 percent of the rabbits developed proliferative-sclerosing GN with progressive renal failure which was fatal 4 to 7 months following injection of anti-GBM IgG.

Glomerular injury was characterized by potentially nephritogenic diffusible fragments of the GBM which accumulated in the urine.

Urinary GBM fragments were partially purified by ion-exchange chromatography gel filtration and affinity chromatography using protein A-Sepharose.

As inferred from double diffusion analysis the enriched fragments precipitated specifically with anti-GBM IgG and showed partial immunologic identity with collagenase- and trypsin-solubilized GBM respectively. Evidence was presented by sequential studies, that peripheral lymphocytes from nephritic rabbits could be stimulated in vitro for blast transformation in the presence of GBM antigens. The studies showed that the acute glomerular attack is accompanied by lymphocytes preferentially sensitive to the disaccharide-containing collagen like structure of the GBM. During the progressive stage however the sensitivity of lympho-

cytes was primarily directed against noncollagenous glycoproteins to which heteropolysaccharid units are linked. In few experiments it has been demonstrated, that the antigenic determinants important for stimulating sensitized lymphocytes were also present in urinary GBM fragments. The data support the possibility that sensitized lymphocytes may be of pathogenetic significance in the production of progressive renal injury.

6. Literaturverzeichnis

1. Astrup, T., and Müllertz, S.:
The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity.
Arch. Biochem. Biophys., 40, 346-351, (1952)
2. Avrameas, S., and Ternynck T.:
The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use
for the preparation of immunoadsorbents.
Immunochemistry, 6, 53-66, (1969)
3. Bailey, J.L.:
Techniques in Protein Chemistry.
299-301, Elsevier Publ., Amsterdam, (1962)
4. Bardos, P., Muh, J. P., Luthier, B., Devulder, B., and Taquet, A.:
Immunochemical study of some glycoproteins of the rat glomerular
basement membrane.
Comp. Biochem. Physiol., 53B, 49-56, (1976)
5. Berggård, J.:
In: Methods in Immunology and Immunochemistry,
Academic Press, New York, II., 128-131 (1968)
6. Boesken, W.H., Meinhardt, K., Rentsch, J., and Hammer, D.K.:
Characterization of basement membrane antigens present in the
urine of normal and nephritic rabbits.
Int. Arch. Allergy, appl. Immunol., 43, 232-251 (1972)
7. Böyum, A.:
A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lympho-
cytes from human blood.
Scand. Clin. and Lab. Invest., Suppl., 97, 77-89, (1967)
8. Bürkle, P.A., Bretzel, R. und Federlin, K.:
Untersuchungen zur cellulären Immunreaktion in vitro gegen Nieren-
antigen bei Patienten mit chronischer Nierenentzündung.
Verh. dt. Ges. Inn. Med., 78, 877-880, (1972)

9. Burck, H.C.:
Histologische Technik.
Verlag Georg Thieme, Stuttgart, 148-149, (1973)
10. Cochrane, C.G., and Koffler, D.:
Immune complex disease in experimental animals and man.
Adv. Immunol., 16, 185-253, (1973)
11. Cuatrecasas, P.:
Protein purification by affinity chromatography.
J. Biol. Chem., 245, 3059-3065, (1970)
12. Davis, B.J.:
Disc-Electrophoresis - II. Method and Application to Human Serum
Proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404-427, (1964)
13. Dixon, F.J.:
What are sensitized cells doing in glomerulonephritis?
N. Engl. J. Med., 283, 536-541, (1969)
14. Dodge, J.T., Mitchell, C., and Hanahan, D.J.:
The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free
ghosts of human erythrocytes.
Arch. Biochem. Biophys., 100, 119-130, (1963)
15. Doellgast, G., and Plaut, A.:
Purification of human IgA by salt-mediated hydrophobic chromatography.
Immunochemistry, 13, 113-139, (1976)
16. Franěk, F., and Šimek, L.:
The antibody response of pigs to dinitrophenylated bovine IgG
administered with a novel type of adjuvant.
Eur. J. Immunol., 1, 300-302, (1971)
17. Hammer, D.K., and Dixon, F.J.:
Experimental glomerulonephritis. II. Immunologic events in the
pathogenesis of nephrotoxic serum nephritis in rats.
J. Exp. Med., 117, 1019-1034, (1963)

18. Hammer, D.K., Kickhöfen, B., and Henning, G.:

Molecular classes and properties of antibodies in cattle serum and colostrum synthesized during the primary and secondary response to protein antigens.

Eur. J. Biochem., 6, 443-454, (1968)

19. Hammer, D.:

Experimental glomerulonephritis in unresponsive rabbits after breaking immunologic tolerance.

In: Pathogenesis and Etiology of Demyelating Diseases.

Add. ad. Int. Arch. Allergy, appl. Immunol., Karger, Basel, 36, 401-404, (1969)

20. Hawkins, D., and Cochrane, C.G.:

Glomerular basement membrane damage in immunological glomerulonephritis.

Immunology 14, 665-681, (1968)

21. Hirschfeld, J.:

Immunelectrophoresis - procedure and application to the group-specific variations in sera.

Sci. Tools (Stockholm), 7, 18-27, (1960)

22. Hjelm, H., Hjelm, K., and Sjöquist, J.:

Protein A from Staphylococcus aureus. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins.

FEBS Letters, 28, 73-76, (1972)

23. Huang, F., and Kalant, N.:

Isolation and characterization of antigenic components of rat glomerular basement membrane.

Can. J. Biochem., 46, 1523-1532, (1968)

24. Janoff, A., and Zelig, J.D.:

Vascular injury and lysis of basement membrane in vitro by neutral protease of human leucocytes.

Science, 616, 702-704, (1968)

25. Joustra, M., and Lundgren, H.:
Preparation of freeze-dried, monomeric and immunochemically pure IgG by a rapid and reproducible chromatographic technique. Protides of the Biological Fluids, 17th Colloq., 511-515, (1969)
26. Kefalides, N.A.:
Structure and biosynthesis of basement membranes. Int. Rev. Conn. Tiss. Res., 6, 63-101, (1973)
27. Kickhöfen, B., Warth, R., and Scheel, D.:
Partial fragmentation of bovine gammaglobulin with papain. Separation of the fragments by automated recycling chromatography. Sci. Tools (Stockholm), 12, 1-4, (1965)
28. Kickhöfen, B., Hammer, D.K., and Scheel, D.:
Isolation and characterization of γ G type immunoglobulins from bovine serum and colostrum. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 349, 1755-1773, (1968)
29. Krakower, C.A., and Greenspon, S.A.:
Localization of the nephrotoxic antigen within the isolated renal glomerulus. Arch. Path., 51, 629-639, (1951)
30. Lazarus, G.S., Daniels, J.R., Lian, J., and Burleigh, M.C.:
Role of granulocyte collagenase in collagen degradation. Am. J. Pathol., 68, 565-576, (1972)
31. Lehotay, D.C.:
Studies of normal and nephritic rat glomerular basement membrane. Biochim. Biophys. Acta, 394, 193-203, (1975)
32. Lerner, R.A., Glassock, R.J., and Dixon, F.J.:
The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. J. Exp. Med., 126, 989-1004, (1967)

33. Lerner, R.A., and Dixon, F.J.:

The induction of acute glomerulonephritis in rabbits with soluble antigens isolated from normal homologous and auto-logous urine.

J. Immunol., 6, 100, 1277-1287, (1968)

34. Levy, H.B., and Sober, H.A.:

A simple chromatographic method for preparation of gammaglobulin.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 103, 250-254, (1960)

35. Lowry, O.H., Roberts, N.R., Leiner, K.Y., Wu, M.L., and Farr, A.L.:

The quantitative histochemistry of brain. I. Chemical methods.

J. Biol. Chem., 207, 1-17, (1954)

36. McCluskey, R. T.:

The value of immunofluorescence in the study of human renal disease.

J. Exp. Med., 134, 243s-255s, (1971)

37. Macanovic, M., Evans, D.J., and Peters, D.K.:

Allergic response to glomerular basement membrane in patients with glomerulonephritis.

Lancet II, 207-210, (1972)

38. Mc Phaul, J.J., and Dixon, F.J.:

Immunoreactive basement membrane antigens in normal human urine and serum.

J. Exp. Med., 130, 1395-1409, (1969)

39. Mc Phaul, J.J., and Mullins, J.D.:

Glomerulonephritis mediated by antibody to glomerular basement membrane. Immunological, clinical, and histopathological characteristics.

J. Clin. Invest., 57, 351-361, (1976)

40. Mahieu, P.M., Lambert, P.H., and Maghuln-Rogister, G.R.:

Primary structure of a small glycopeptide isolated from human glomerular basement membrane and carrying a major antigenic site.

Eur. J. Biochem., 40, 599-606, (1973)

41. Mahieu, P.M., and Maghuin-Rogister, G.R.:
Purification of basement membrane antigens from normal human urine
by affinity chromatography.
Protides Biol. Fluids, 21st Colloq., 467-471, (1974)
42. Mann, K.G., Fish, W.W., Cox, A.C., and Tanford, C.:
Single chain nature of human serum transferrin.
Biochemistry, 9, 1348-1354, (1970)
43. Marquardt, H., Wilson, C., and Dixon, F.:
Isolation and immunological characterization of human glomerular
basement membrane antigens.
Kidney International, 3, 57-65, (1973)
44. Maurer, R.:
Disk-Elektrophorese.
Walter de Gruyter Verlag, Berlin, 67-68, (1968)
45. Masugi, M.:
Über das Wesen der spezifischen Veränderungen der Niere und der
Leber durch das Nephrotoxin bzw. das Hepatotoxin. Zugleich ein
Beitrag zur Pathogenese der Glomerulonephritis und der eklamp-
tischen Lebererkrankung.
Beitr. path. Anat., 91, 82-112, (1933)
46. Misra, R.P., and Berman, L.B.:
Studies on glomerular basement membrane. III. Effects of steroid
on membrane chemistry and its protein permeability.
Lab. Invest., 26, 666-670, (1972)
47. Duchterlony, Ü.:
Handbook of Experimental Immunology.
(Hrsg.: Weir, D.M.)
Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 655-706, (1967)
48. Peterkofsky, B., and Diegelmann, R.:
Use of a mixture of proteinase-free-collagenases for the specific
assay of radioactive collagen in the presence of other proteins.
Biochemistry, 10, 988-994, (1971)

49. Pfeiffer, E.F., Müller-Ruchholtz, W., and Federlin, K.:
Transfer of nephrotoxic glomerulonephritis in rats by means
of white blood cells.
Nature, 195, 718-719, (1962)
50. Rocklin, R.E., Lewis, E.J., and David J.R.:
In vitro evidence for cellular hypersensitivity to glomerular
basement membrane antigens in human glomerulonephritis.
N. Engl. J. Med., 283, 10, 497-501, (1970)
51. Romeis, B.:
Mikroskopische Technik.
Verlag Oldenburg, München, 156-157, (1948)
52. Scheidegger, J.J.:
Une micro-méthode de l'immune-électrophorèse.
Intern. Arch. Allergy appl. Immunol., 7, 103-110, (1955)
53. Schmitz-Hübner, U., Bätjer, B., and Mossmann, H.:
Purification of a nephritogenic glycoprotein from the urine of
rabbits with experimental glomerulonephritis (GN).
Vortrag Okt. 1974, Tagung der Ges. f. Immunologie,
Zeitschr. für Immunitätsforschung, 150, 237, (1974)
54. Schmitz-Hübner, U., and Hammer, D.K.:
Aspects of cell-mediated immunity in chronic nephrotoxic nephritis.
Contr. Nephrol., Karger, Basel, 2, 99-103, (1976)
55. Seegal, B.C.:
In vivo localization of specific antiorgan sera: relation to occurrence
of renal lesions.
In: Mechanisms of Hypersensitivity, Little, Brown & Co., Boston,
143-154, (1959)
56. Shibata, S., Migakawa, Y., Naruse, T., Nagasawa, T., and Takuma, T.:
A glycoprotein that induces nephrotoxic antibody: Its isolation and
purification from rat glomerular basement membrane.
J. Immunol., 102, 593-601, (1969)

57. Sjöquist, J., Meloun, B., and Hjelm, H.:
Protein A isolated from *Staphylococcus aureus* after digestion
with lysostaphin.
Eur. J. Biochem., 29, 572-578, (1972)
58. Skoza, L., and Mohos, S.C.:
Enzymatic solubilization and separation of glomerular collagen
and sialoprotein. Effect of contaminating enzymes present in
commercial collagenase preparations.
Lab. Invest., 30, 93-101, (1974)
59. Sober, H.A., and Harte, R.A.:
Handbook of Biochemistry. Selected data for molecular biology.
The Chemical Rubber Co., Ohio, Section C, (1968)
60. Spiro, R.G.:
Studies on the renal glomerular basement membrane.
J. Biol. Chem., 242, 1915-1923, (1967),
and 1923-1932, (1967)
61. Spiro, R.G.:
The structure of the disaccharide unit of the renal glomerular
basement membrane.
J. Biol. Chem., 242, 4813-4823, (1967)
62. Spiro, R.G.:
Glycoproteins: Their biochemistry, biology and the role in human
disease.
N. Engl. J. Med., 281, 991-1043, (1969)
63. Spiro, R.G.:
Biochemistry of basement membrane.
In: *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix*,
Academic Press, Boston, USA, 1, 511-534, (1970)
64. Steblay, R.W.:
Glomerulonephritis induced in sheep by injections of heterologous
glomerular basement membrane and Freund's complete adjuvant.
J. Exp. Med., 116, 253-271, (1962)

65. Steblay, R.W., and Rudofsky, U.:
Autoimmune glomerulonephritis induced in sheep by injections
of human lung and Freund's adjuvant.
Science, 160, 204-206, (1968)
66. Thoenes, G.H., and Hammer, D.K.:
Immunochemische Untersuchungen am nephrotoxischen Antigen der glomerulären Basalmembran.
Clin. Chim. Acta, 18, 253-265, (1967)
67. Treser, G., Semar, M., Ty, A., Sagel, I., Franklin, M.A., and Lange, K.:
Partial characterization of antigenic streptococcal plasma membrane components in acute glomerulonephritis.
J. Clin. Invest., 49, 762-768, (1970)
68. Unanue, E.R., and Dixon, F.J.:
Experimental glomerulonephritis. V. Studies on the interaction of nephrotoxic antibodies with tissues of the rat.
J. Exp. Med., 121, 697-714, (1965)
69. Unanue, E.R., Dixon, F.J., and Feldmann, J.D.:
Experimental allergic glomerulonephritis induced in the rabbit with homologous renal antigens.
J. Exp. Med., 125, 163-176, (1967)
70. Verroust, P.J., Wilson, C.B., Cooper, N.R., Edgington, S.T. and Dixon, F.J.:
Glomerular complement components in human glomerulonephritis.
J. Clin. Invest., 53, 77-84, (1974)
71. Weber, K., and Osborn, M.:
The reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis.
J. Biol. Chem., 244, 4406-4412, (1969)

72. Weichselbaum, T.E.:

An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma.

Am. J. Clin. Pathol., Tech. Sect., 10, 40-49, (1946)

73. Wilson, C.B., and Dixon, F.J.:

Immunopathology and glomerulonephritis.

Ann. Rev. Med., 25, 83-98, (1974)

74. Wilson, C.B., Henderson, W., and Dixon, F.J.:

Glomerulonephritis.

DM-Disease, a month series, 22, 2-66, (1976)

75. Wünnach, E. und Heydrich, H.G.:

Zur quantitativen Bestimmung der Collagenase.

Hoppe Seyler's Z. f. Physiol. Chemie, 333, 149-151, (1963)

Lebenslauf

Am 21. Juli 1948 wurde ich als Tochter des Architekten Dr. Ing. Friedrich W. Bätjer und seiner Ehefrau, der Lehrerin Constance Bätjer, geb. Schütte, in Kassel geboren.

Nach der Volksschulzeit von 1954 bis 1958 besuchte ich die Heinrich-Schütz-Schule in Kassel und legte im Juli 1967 die Reifeprüfung an der Melanchthon-Schule in Steinatal, Kreis Treysa, ab.

Im Oktober 1967 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover, wo ich im Oktober 1969 das Physikum ablegte. Anschließend immatrikulierte ich mich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München und schloß das Studium dort im März 1973 mit dem Staatsexamen ab.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom März 1974 bis Dezember 1976, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. D. K. Hammer.

